Radu Olinescu

PEROXIDAREA

în CHIMIE, BIOLOGIE și MEDICINĂ

RADU OLINESCU

PEROXIDAREA
ÎN CHIMIE, BIOLOGIE ȘI MEDICINĂ

EDITURA ȘTIINȚIFICĂ ȘI ENCICLOPEDICĂ
BUCUREȘTI, 1982

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

PREFAȚĂ 9

Capitolul 1. **ACTIVAREA OXIGENULUI** 11

1.1. Configurația atomică și moleculară a oxigenului 11
1.2. Singlet oxigen, $^1O_2$ 14
1.3. Reducerea O_2 la H_2O 17
1.4. Superoxidul 19
1.5. Radicalul hidroxil 22
Bibliografie 24

Capitolul 2. **PROCESUL DE PEROXIDARE** 27

2.1. Autooxidare și peroxidare 27
2.2. Cinetica peroxidării 29
2.3. Studii termochimice 34
2.4. Efectul agenților fizico-chimici 36
Bibliografie 40

Capitolul 3. **PEROXIZI** 42

3.1. Substraturi 42
3.2. Descompunerea peroxizilor 49
3.3. Prooxidanți 54
3.4. Epoxizi 57
Bibliografie 58

Capitolul 4. **ACȚIUNEA RADIAȚIILOR UV ȘI IONIZANTE** 61

4.1. Reacții de fotooxidare 61
4.2. Reacții de fotosensibilizare 67
4.3. Chemiluminiscență 74
4.4. Acțiunea radiațiilor ionizante 77
Bibliografie 80

Capitolul 5. **ANTIOXIDANȚI** 83

5.1. Caracteristici și clasificare 83
5.2. Mecanism prin întreruperea autooxidării în lanț 86
5.3. Mecanisme de prevenire 88
5.3.1. Deactivatori ai ionilor metalici 89
5.3.2. Deactivatori ai radiațiilor ultraviolete 90
5.3.3. Substanțe ce descompun peroxizii 91
5.4. Sinergism în acțiunea antioxidanților 92
Bibliografie 95

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 6. **APLICAȚII ÎN INDUSTRIE** 97
6.1. Combustibili și lubrifianți 97
6.2. Polimeri 101
6.2.1. Poliolefine 102
6.2.2. Policlorură de vinil 103
6.2.3. Celuloză 105
6.2.4. Poliamide și poliuretani 106
6.2.5. Peroxizi ca agenți ai polimerizării și ramificării 107
6.2.6. Acțiunea radiațiilor ionizante asupra polimerilor 107
6.3. Cauciucul 109
6.3.1. Cauciucul sintetic 111
6.3.2. Cauciucul vulcanizat 111
6.4. Grăsimi și uleiuri 112
6.5. Alimentele 113
6.6. Utilizarea industrială a peroxizilor 114
Bibliografie 115

Capitolul 7. **PEROXIZII ÎN MEDII BIOLOGICE** 118
7.1. Oxigenul, formele lui active și viața 118
7.2. Sisteme biochimice de formare a peroxizilor 120
7.3. Substraturi ale peroxidării în medii biologice 123
7.4. Prooxidanți în medii biologice 125
7.4.1. Ioni metalici 125
7.4.2. Hemoproteine 126
7.4.3. Acidul ascorbic 127
7.4.4. Lipoxigenaza 127
7.5. Peroxidarea lipidelor în procese fiziologice 128
7.5.1. Metabolizarea medicamentelor 128
7.5.2. Prostaglandine 131
7.5.3. Agregarea trombocitelor 133
Bibliografie 136

Capitolul 8. **PROCESE BIOCHIMICE ÎN CARE SE FORMEAZĂ H_2O_2** 139
8.1. Reducerea O_2 139
8.1.1. Efectul ionilor metalelor de tranziție 139
8.1.2. Oxidoreductaze 141
8.1.3. Peroxizomi 144
8.1.4. Mitocondrii 145
8.2. Fagocitoza 149
8.3. H_2O_2 și mieloperoxidaza 153
8.4. Fotosinteza 156
Bibliografie 158

Capitolul 9. **SISTEME DE PROTECȚIE CONTRA PEROXIZILOR ÎN ORGANISME** 161
9.1. Sisteme neenzimatice 162
9.1.1. Hemoproteine 162
9.1.2. Acidul ascorbic 163
9.1.3. Vitamina E 164
9.1.4. Seleniul 165
9.1.5. Compuși conținînd sulf sau grupări sulfhidril 166

Scanned with OKEN Scanner

9.2. Superoxid dismutaza 166
9.3. Catalaza 170
9.4. Peroxidaze 173
9.5. Glutation peroxidaza 176
Bibliografie 179

Capitolul 10. **STĂRI PATOLOGICE I** (Peroxizi lipidici) 182
10.1. Oxidarea grupărilor sulfihidril 183
10.2. Membrane celulare şi subcelulare 186
10.3. Stări patologice asociate modificărilor membranelor 191
10.3.1. Hiperoxie 192
10.3.2. Bătrîneţea 192
10.3.3. Hepatotoxicitate 194
10.3.4. Anemii hemolitice 196
10.4. Ateroscleroza şi diabetul 197
10.5. Inflamaţii 199
Bibliografie 201

Capitolul 11. **STĂRI PATOLOGICE II** (Peroxizi ai acizilor nucleici) 204
11.1. Peroxizi ai acizilor nucleici, mutaţii 204
11.2. Acţiunea fotodinamică a radiaţiilor UV şi ozonului 208
11.3. Boala de iradiere 213
11.4. Neoplazii 218
11.5. Peroxizii — agenţi citotoxici 222
Bibliografie 224

Capitolul 12. **DETERMINAREA PEROXIZILOR ŞI A ANTIOXIDANŢILOR NATURALI** 227
12.1. Generalităţi 227
12.2. Determinări în medii nebiologice 228
12.3. Determinări în medii biologice 229
12.4. Determinarea antioxidanţilor naturali 232

Bibliografie 235

Postfaţă 238

Scanned with OKEN Scanner

PREFAȚĂ

A cunoaşte înseamnă a prevedea. A cunoaşte mecanismele ce stau la baza unor procese ce se desfăşoară în jurul nostru înseamnă a ridica cercetarea ştiinţifică la un nivel calitativ superior şi a găsi soluţii de evitare a deteriorării unor valori naturale sau materiale.

Există o legătură directă între fenomene ca brunificarea unor uleiuri, oxidarea unor hidrocarburi, deteriorarea oxidativă a cauciucului sau a unor polimeri, rîncezirea grăsimilor şi unele procese biochimice sau stări patologice? Aceasta este întrebarea şi ideea centrală a cărţii, întrebare la care m-am străduit să răspund.

Cerinţele industriei au impus între anii 1947—1960 eforturi considerabile pentru elucidarea mecanismelor autooxidării în general şi a peroxidării în special, cît şi pentru a găsi metode practice de protejare. Implicarea oxigenului şi a peroxidării în fenomenele fizico-chimice menţionate este astăzi unanim acceptată. Rolul lor însă în biochimie, fiziologie sau patologie formează încă obiectul unor numeroase studii de actualitate.

În prima parte a cărţii se descriu mecanismele generale de activare a oxigenului şi de peroxidare sub diferite aspecte cu referire la medii nebiologice. Această parte se încheie cu capitole privitor la antioxidanţi şi la aplicaţii industriale.

A doua parte şi cea mai originală este dedicată peroxidării în medii biologice şi a condiţiilor ce modifică mecanismele generale descrise anterior. Peroxidarea este prezentată ca un proces pe care organismul îl foloseşte fiziologic pentru modificarea pe cale oxidativă a unor structuri organice sau morfologice. Din cauze încă neclare, peroxidarea poate depăşi acest aspect cît şi sistemele de control biochimic devenind astfel o condiţie etiologică a unor boli sau de agravare a altora. Prezenţa unor antioxidanţi naturali ce acţionează după mecanisme diferite şi eficiente dovedeşte adaptarea organismelor şi reglarea strictă a concentraţiei peroxizilor.

Întreaga prezentare este bogat documentată cu peste 1000 date bibliografice. Pentru a face faţă numeroaselor lucrări din acest domeniu

Scanned with OKEN Scanner

am preferat menţionarea doar a lucrărilor mai noi, mai accesibile, sau indicarea unor referate exhaustive.

Contribuţia originală la înţelegerea şi abordarea experimentală a acestui domeniu este rodul a 11 ani de studii pe care autorul i-a dedicat şi care s-au concretizat în această carte.

În consecinţă, materialul expus se adresează cercetătorilor cu specialităţi diverse, cuprinzînd chimişti, ingineri, biologi, biochimişti, medici, care au venit în contact, sub diferite forme, cu cîte un aspect al procesului de peroxidare.

AUTORUL

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 1

ACTIVAREA OXIGENULUI

1.1. CONFIGURAŢIA ATOMICĂ ŞI MOLECULARĂ A OXIGENULUI

Oxigenul reprezintă unul din cazurile cele mai curioase din ştiinţă. Deşi este unul din elementele cele mai abundente din natură, indispensabil vieţii sub formă aerobă, deşi a fost descoperit în 1775 independent de Scheele şi Priestley, de-abia în ultimii 10 ani s-a realizat că oxigenul este incomplet cunoscut, mai ales ca proprietăţi biologice, iar vechile teorii despre peroxidare trebuie reconsiderate.

Reacţiile oxigenului cu substanţele organice, deşi sînt exotermice, nu se produc cu viteze perceptibile la temperaturile obişnuite. Reactivitatea oxigenului este mult mai mică decît ne-am aştepta, iar proprietăţile paramagnetice sînt neobişnuite pentru un gaz. Deci, pe de o parte o reactivitate mică în anumite limite a oxigenului în stare de gaz, iar pe de altă parte o reactivitate mare manifestată faţă de metale, plastice şi alte macromolecule, mergînd pînă la toxicitate faţă de organismele vii. Răspunsul la această situaţie aparent paradoxală a fost dat prin cercetări efectuate în ultimii 10—15 ani, care au arătat că oxigenul poate acţiona rapid în anumite condiţii numai printr-o activare. Această activare se realizează prin specii reactive provenind atît de la oxigenul atomic, cît şi de la cel molecular. Aceste specii reactive posedă toate caracteristicele unor radicali liberi, deşi chiar oxigenul molecular este socotit ca un diradical.

De aceea, pentru înţelegerea activării oxigenului, a capacităţii de peroxidare, a rolului variat şi complex, deosebit de important, asupra organismelor vii şi a unor compuşi chimici sau produse industriale este necesară înţelegerea structurii atomului şi a moleculei de oxigen. Configuraţia straturilor de electroni ale oxigenului atomic prezintă de asemenea particularităţi deosebite. Cei 6 electroni periferici ai atomului de oxigen sînt dispuşi conform formulei generale $1s^2\ 2s^2\ 2p^4$ şi a schemei din fig. 1.1 A.

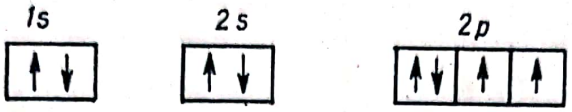
Conform mecanicii cuantice, un orbital este complet cînd conţine 2 electroni, iar spinii lor sînt opuşi. Or în stratul $2p$ există 2 „găuri" observabile în fig. 1 B la ionii oxigenului, spre deosebire de electronii s din primii orbitali ce sînt stabil completaţi $(1s)^2$ şi $(2s)^2$. Orbitalii $2p$ au aceeaşi stabilitate, conţin cîte 1 electron pe orbital şi au acelaşi tip de spin. Dacă un orbital conţine numai un electron impar, spinul său va conferi paramagnetism datorită momentului său magnetic. Tendinţa puternică de imperechere a electronilor din orbitali conferă o mare reactivitate observată la specia O^- şi la radicalul hidroxil $OH^\cdot$ [57].

Configuraţia electronică a atomului de oxigen explică instabilitatea acestuia şi necesitatea existenţei în condiţii obişnuite a oxigenului molecular. Dar şi molecula de oxigen prezintă particularităţi deosebite. Astfel

Scanned with OKEN Scanner

O_2 conține 12 electroni periferici din care 2 vor fi impari conferind paramagnetism moleculei. Electronii pari nu interacționează cu un cîmp magnetic deoarece cîmpurile lor magnetice sînt orientate în sensuri opuse, anulîndu-se reciproc. 10 electroni sînt dispuși în perechi în 5 orbitali com-

A.



B.

Specia	Orbitali 2p de stabilitate egală			Electroni neîmperecheați
	$2p_x$	$2p_y$	$2p_z$	
O	↑↓	↑	↑	2
O^-	↑↓	↑↓	↑	1
O^{--}	↑↓	↑↓	↑↓	0

Fig. 1.1. A Configurația electronică a atomului de oxigen. B. Orbitalii atomici aparținînd ionilor de oxigen (electroni *p*). Săgețile indică sensul spinului electronilor. *x*, *y*, *z* reprezintă coordonatele de spațiu. O^- este forma ionizată a ionului OH^0, iar O^{--} este forma complet ionizată a H_2O.

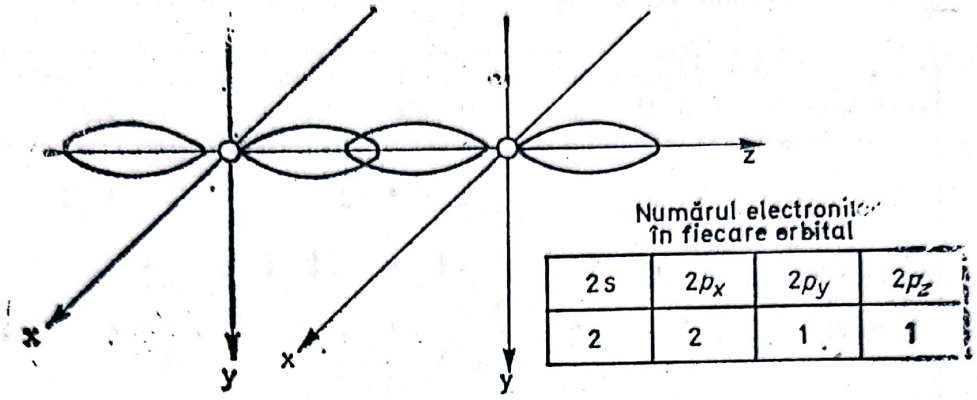
pleți. Deci cei 2 electroni de valență proveniți de pe nivelele *L* ale celor 2 atomi de oxigen sînt așezați pe orbitali moleculari obținuți din orbitalii atomici, rezultînd o configurație cu energie minimă. Diagrama orbitalilor oxigenului molecular în stare fundamentală este reprezentată în fig. 1.2.

Se observă că cei 2 orbitali atomici 2*s* interacționează și dau naștere la 2 orbitali moleculari corespunzînd la 2 nivele, unul de legătură σ_{2s} și altul de antilegătură σ^*_{2s}; aceeași situație observîndu-se și pentru perechea de orbitali $2p_z$, respectiv σ_z și σ^*_z. Orbitalii atomici $2p_x$ și $2p_y$ de la cei doi atomi de O se combină și dau împreună orbitalii moleculari π și π^* care sînt dublu degenerați deoarece au energii echivalente. Orbitalii moleculari de legătură σ au o energie mai joasă decît cei de legătură π. Pentru completarea tuturor orbitalilor perechilor neparticipante ar fi necesari 14 electroni. Oricum cei doi electroni puși în comun aparțin orbitalilor perechilor de antilegătură π^* și vor avea spini antiparaleli, conferind moleculei de oxigen, O_2, un caracter paramagnetic. Schematic, O_2 are următoarea repartiție a electronilor: 8 electroni de legătură $(\sigma_{2s})^2$, $(\sigma_{2pz})^2$, $(\pi_{2py,\ 2px})^4$ și 4 electroni de antilegătură $(\sigma^*_{2s})^2$ și $(\pi^*_{2py,\ 2px})^2$.

Ce se întîmplă în cazul cedării unei perechi de electroni oxigenului molecular de către un reducător? Această pereche de electroni nu poate completa orbitalii liberi din interiorul moleculei O_2 din cauza perturbării momentelor magnetice. Pentru a fi realizabilă adiția acestor electroni cu spini paraleli, va fi necesară o inversiune de spin a unui electron al O_2 permițînd astfel un transfer de electroni. Dar inversia de spin este un proces lent cu probabilitate mică chiar dacă O_2 și reducătorul respectiv sînt apro-

Scanned with OKEN Scanner

piaţi [27]. Necesitatea unei inversii de spin constituie o barieră pentru reactivitatea oxigenului molecular. Aşa se explică de ce O_2, deşi are un caracter de radical liber, avînd electroni impari, prezintă totuşi o reactivitate limitată în condiţii obişnuite.



Numărul electronilor în fiecare orbital

2s	$2p_x$	$2p_y$	$2p_z$
2	2	1	1

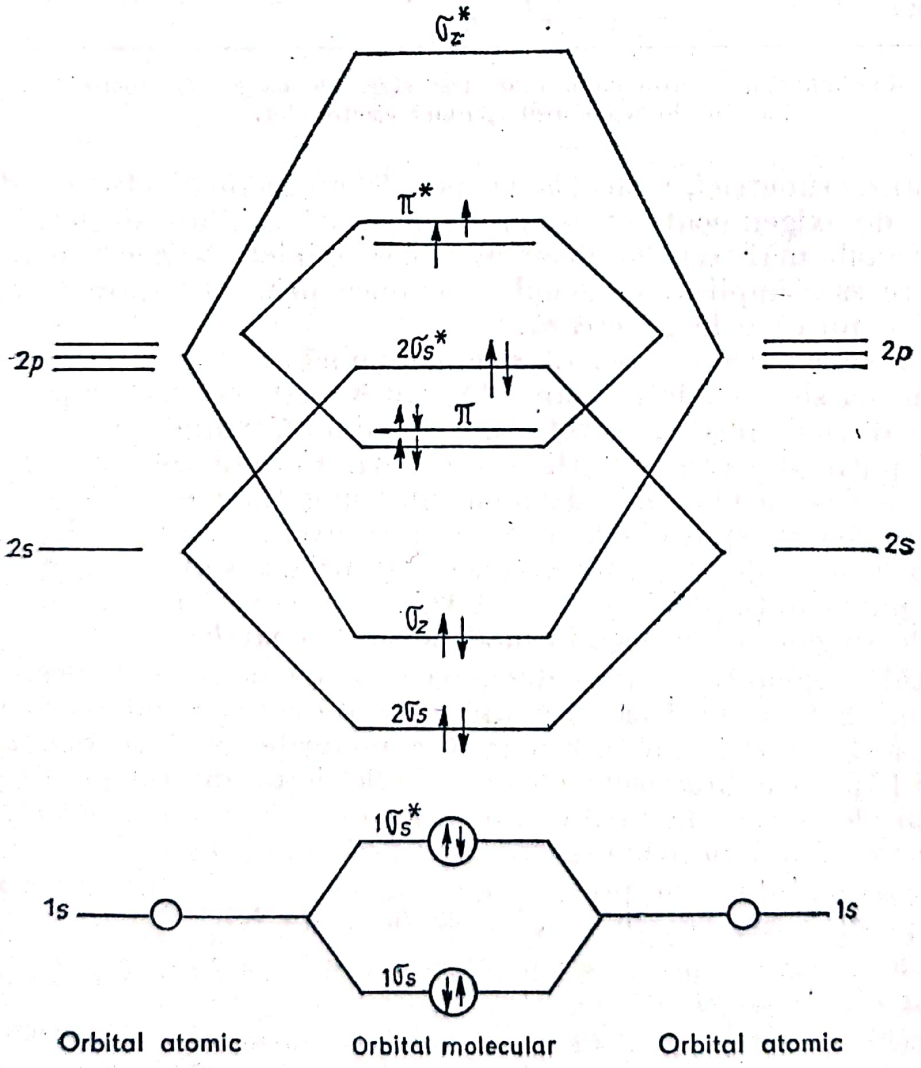


Fig. 1.2. Diagrama orbitalilor oxigenului molecular.

Scanned with OKEN Scanner

1.2. SINGLET OXIGEN, $^1O_2$

Oxigenul molecular în stare fundamentală se caracterizează deci prin 2 electroni neparticipanţi cu moment unghiular opus situaţi pe 2 orbitali diferiţi şi cu spini paraleli. Această stare a O_2 se numeşte triplet se, notează cu $^3\Sigma_g$ şi este considerată ca cea mai stabilă din punct de vedere ener-

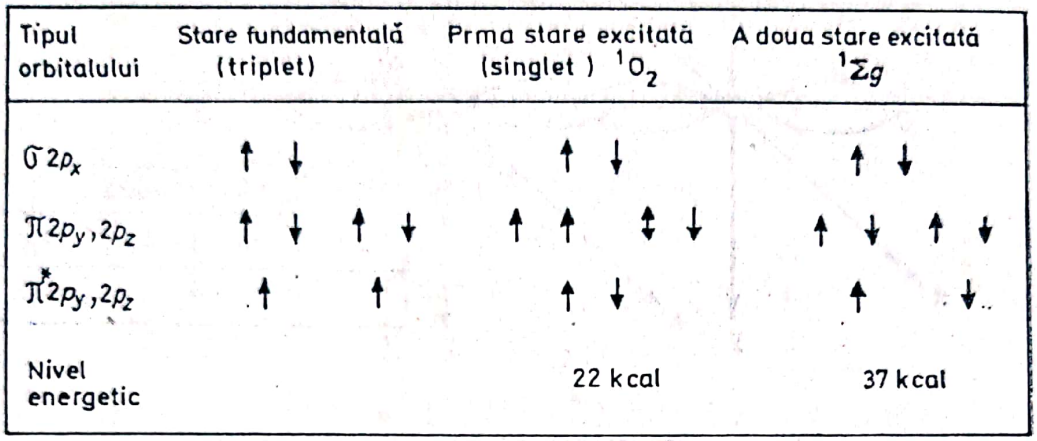


Fig. 1.3. Configuraţia electronică a celor trei stări ale oxigenului molecular. Săgeţile indică sensul spinului electronilor.

getic. Din cauza simetriei, molecula nu posedă un moment electric dipolar. Molecula de oxigen poate exista însă şi în stări excitate singlet, bogat energetice şi mult mai reactive decît în starea triplet. Numărul mare de reacţii în care este implicat oxigenul se explică prin varietatea mare de specii reactive pe care le generează.

Aşa cum se observă din fig. 1.3 se cunosc pînă în prezent două specii de singlet; prima stare excitată notată $^1\Delta_g$ sau $^1O_2$ este cea mai importantă deoarece are o viaţă medie, teoretic de 45 minute, redusă însă practic la mult mai puţin din cauza marii reactivităţi. Cei doi electroni impari se găsesc pe acelaşi orbital, în care momentul unghiular este identic. Cei 2 electroni impari au spin opus. A doua stare excitată, notată $^1\Sigma$ are o viaţă de 10^{-9} secunde, transformîndu-se în prima stare singlet [25], înainte de a putea iniţia reacţii chimice. Din acest considerent major prin denumirea de singlet se înţelege în mod obişnuit doar $^1O_2$.

Singletul oxigenului a fost descoperit în cursul măsurătorilor de absorbţia luminii în atmosferă încă din 1931 de către Childs şi Meckle [14], dar de-abia în 1965 au fost reluate cercetările de către Badger şi colaboratorii [6]. Structura electronică a O_2 indică imposibilitatea existenţei unor tranziţii electronice în vizibil sau ultraviolet, în schimb singletul a fost detectat în vizibil, cu benzi la 629, 577 şi 477 nm [21].

Se cunosc multe căi de producere a singletului şi în literatură apar mereu alte procese sau reacţii în care se dezvoltă $^1O_2$.

Reacţiile în care se produce singlet sînt prezentate în fig. 1.4 şi vor fi descrise în sensul acelor de ceas:

a) reacţiile de fotosensibilizare vor fi descrise separat în Capitolul 4;

b) reacţia H_2O_2 cu o hipohalogenură de tipul OCl^- este cea mai cunoscută şi mai des utilizată [4, 50];

Scanned with OKEN Scanner

c) reacţia H_2O_2 cu un alt radical al oxigenului, superoxid O_2^-, este considerată ca o sursă potenţială de $^1O_2$ de interes biologic [40];

d) reacţia radicalului hidroxil OH· cu O_2^- produce $^1O_2$ [3]. Ca şi în cazul precedent (c), OH· este un alt produs al reacţiei Haber-Weiss descrisă în 1934 (32) şi reactualizată mai ales în procese biologice;

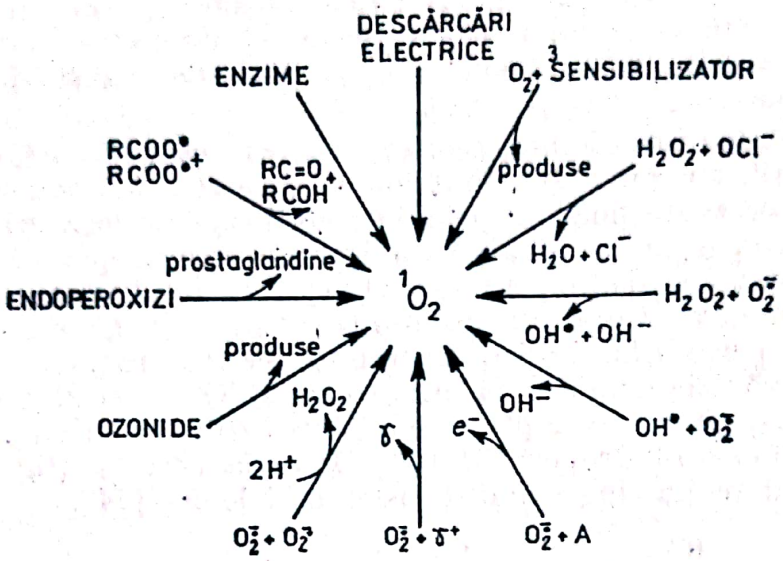


Fig. 1.4. Procesele fizice, chimice şi biochimice în care este implicat oxigenul în formă singlet, $^1O_2$.

e) transferul unui electron de la O_2^- la un acceptor adecvat, reacţie evidenţiată în cloroplaste iluminate [71];

f) transferul de electroni de la O_2^- la radicali cationi a fost demonstrat de Mayeda şi Bard [50];

g) dismutarea spontană a 2 O_2^- [3, 41];

h) descompunerea spontană a ozonidelor [68];

i) descompunerea endoperoxizilor [12, 70];

j) descompunerea hidroperoxizilor din microzomi hepatici [42, 53];

k) diverse reacţii catalizate de enzime (Capitolul 7);

l) descărcări în atmosferă, acţiunea microundelor [7, 10, 56].

Cele mai folosite căi de generare a singletului rămîn primele două (a) şi (b), cu toate că nu s-a ajuns la o standardizare a metodelor.

Identificarea singletului este o problemă destul de dificilă, deşi se cunosc mai multe criterii de selecţie. Practic singletul are o viaţă de cîteva μ secunde şi metoda directă ar fi măsurarea energiei eliberate prin descompunerea în O_2 (triplet). Această energie este eliberată sub formă de foton conform ecuaţiei:

$$^1O_2(O_2) \rightarrow {}^3\Sigma_g(O_2) + h\nu.$$

În această reacţie lumina emisă este în infraroşu la 1269 nm şi reprezintă diferenţa de energie dintre singlet şi starea fundamentală $^3\Sigma_g$. Dar singletul poate trece în triplet şi prin emisie „dimol":

$$2\ {}^1O_2(O_2) \rightarrow 2\ {}^3\Sigma_g(O_2) + h\nu;$$

în acest caz lumina este emisă la 634 nm şi poate fi detectată prin reacţii chimice, cum ar fi reacţia $H_2O_2 + OCl^-$.

Scanned with OKEN Scanner

$^1O_2$ poate fi detectat prin folosirea unor inhibitori specifici, ce acţionează asupra oxidărilor iniţiate de singlet sau reacţionează chimic sau fizic. Astfel de substanţe sînt carotenoizi, amine terţiare, tocoferoli, azidă de sodiu şi histidină. O altă metodă a fost sugerată de Merkel şi colaboratorii care au observat că viaţa singletului este prelungită semnificativ în apă deuterată comparativ cu cea obişnuită [51]. În fine, mai sînt unele reacţii chimice, cum ar fi transformarea difenilfuranului în dibenzoetilenă, care prin cuplare pot servi la identificarea singletului printre produsele intermediare [7, 68].

Reactivitatea singletului se aseamănă cu cea a etilenei, dar este mult mai electrofil, iar gama substanţelor cu care reacţionează variază foarte mult. Vom prezenta doar grupele de reacţii care au legătură cu procesele de peroxidare, deoarece singletul oxigenului poate apare ca intermediar şi în reacţii ce nu implică o peroxidare [25]. a) Reacţiile de tip „enă" se produc cu olefine avînd doi sau mai mulţi substituenţi alchilici şi duc la formarea hidroperoxizilor alilici. Exemplul cel mai răspîndit îl constituie formarea peroxizilor lipidici în urma reacţiei $^1O_2$ cu acizi graşi nesaturaţi [63], fig. 5 A. Un alt exemplu este oxidarea colesterolului la 3-β-hidroxi-5-α-colest-6-ene-5-hidroperoxid [66]. Reacţia aceasta (fig. 5 B) a fost propusă ca detecţia singletului în sisteme biologice [74].

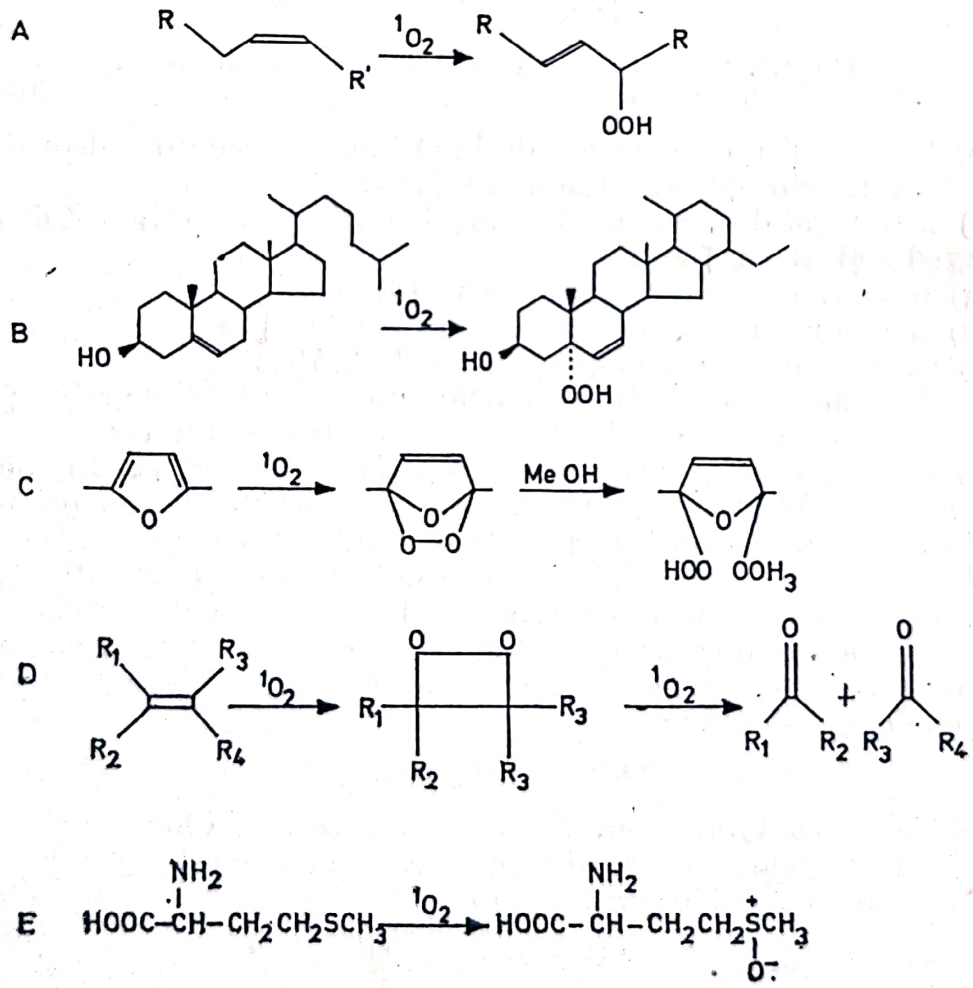


Fig. 1.5. Reacţii ce implică participarea oxigenului în formă de singlet $^1O_2$. Explicaţii în text.

Scanned with OKEN Scanner

b) Adiția în poziția 1,4 la diene și heterocicli conduce la formarea endoperoxizilor cu stabilitate variată. Un exemplu îl constituie reacția cu 1,4-dimetilfuran (fig. 5 c). Adiția singletului la diene pare să fie mecanismul oxidării la aer a rășinilor și terpenelor [52].

c) Olefinele și enaminele pot reacționa cu singlet formînd dioxietani, de obicei instabili, care se descompun în carbonili excitați electronic. Acești din urmă compuși produc o chemiluminiscență detectabilă. Hastings și Wilson [35] au evidențiat rolul potențial al dioxietanilor și dioxietanone în bioluminiscență. În fig. 5 D este prezentată reacția generalizată a formării dioxietanilor. Dioxietani ciclici au fost izolați și prin reacția singletului cu 1,3-diene [11].

d) Compuși conținînd heteroatomi cu sulf sau azot sînt oxidați relativ ușor de singlet. De exemplu metionina este oxidată la sulfoxid (fig. 5 E). Compuși conținînd azot formează *N*-oxizi, sau cum ar fi cazul aminelor terțiare suferă o dealchilare, un exemplu este atropina [25].

e) Un număr din ce în ce mai mare de compuși cu importanță biologică sînt formați sau transformați în reacții în care $^1O_2$ este intermediar. O parte din aceste reacții au loc prin fotooxidări cu coloranți sensibilizanți și vor fi studiate în capitolul 4, iar altă parte, cele ce cuprind o gamă foarte variată de reacții ce au loc în organisme vor fi prezentate în a doua parte a cărții.

Studiul actual al cunoștințelor despre rolul singletului în mecanismul reacțiilor de oxidare și peroxidare depinde foarte mult de sensibilitatea aparaturii utilizate. Introducerea unor metode și aparaturi moderne cum sînt spectroscopul cu microunde, sau cu fotoionizare, spectrometre de masă perfecționate, puls radioliză, rezonanță electronică de spin etc. au permis obținerea cunoștințelor actuale. Parametrii condițiilor experimentale influențează în mare măsură desfășurarea reacției. Ca dovadă a reactivității mari Koch [44] a găsit energii de activare foarte mici în reacțiile $^1O_2$ cu diferiți acceptori. Oricum studiile singletului în stare gazoasă obținut prin descărcări electrice sau fotoionizare permit folosirea mai multor feluri de spectrometre (emisie, rezonanță, infraroșu) sensibile [15]. Descompunerea unui curent de O_2 cu frecvențe radio (2500 Hz) permite chiar obținerea singletului cu randament mare [55].

În schimb, studiul $^1O_2$ în fază condensată este dificil datorită marii dependențe de natura solventului [68], a timpului de viață mai scurt, aproximativ 10^{-6}—10^{-5} secunde, și folosirii mai ales a unor metode chimice [19]. Reactivitatea deosebită a acestei specii reactive este sugerată și de afirmația lui Fridovich [27], după care dacă oxigenul atmosferic ar fi fost compus numai din singlet, viața ar fi fost imposibilă, fiind atacată orice moleculă organică.

1.3. REDUCEREA O_2 LA H_2O

Restricția de spin caracteristică oxigenului molecular se aplică și reducerii bi- și monovalente a acestuia la apă. Reducerea bivalentă poate avea loc numai prin combinarea O_2 cu un ion metalic aparținînd elementelor de tranziție, care este și el paramagnetic, ca în cazul unor enzime ce conțin

Scanned with OKEN Scanner

Cu^{2+}, Fe^{2+}. Reducerea univalentă poate avea loc prin adiţia la O_2 numai a unui electron. Astfel, deşi O_2 este un oxidant puternic avînd un potenţial redox de $+1{,}23$ V, reacţia

$$O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2\,H_2O \qquad (1)$$

decurge foarte încet la temperaturi obişnuite deoarece are loc treptat implicînd reacţii intermediare, cu apariţia unor specii mult mai reactive decît O_2. Reducerea univalentă a O_2 decurge în următoarea secvenţă

$$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot-} \quad \text{sau} \quad O_2 + H^+ + e^- \rightarrow HO_2^{\cdot} \qquad (2)$$

$$O_2^{\cdot-} + e^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 \qquad (3)$$

$$H_2O_2 + e^- + H^+ \rightarrow H_2O + OH^{\cdot} \qquad (4)$$

$$OH^{\cdot} + e^- + H^+ \rightarrow H_2O \qquad (5)$$

Din această secvenţă de reacţii se observă că reducerea univalentă a O_2 cuprinde formarea mai multor specii înalt reactive cum sînt superoxid $O_2^{\cdot-}$ din reacţia (2), peroxidul de hidrogen, H_2O_2 reacţia (3) şi radicalul hidroxil $OH^{\cdot}$ reacţia (4). O viteză mai mare de reducere poate fi obţinută numai cînd acest proces are loc simultan, cuprinzînd toate reacţiile parţiale şi cu un schimb de mai mulţi electroni. Astfel de reducere are loc pe cale enzimatică şi necesită un substrat cu o poziţie sterică fixă, aşa cum este o macromoleculă. Termodinamic, reacţia (2) constituie o barieră dificilă de trecut (potenţialul redox este de $-0{,}32$ eV) şi este o consecinţă a particularităţilor configuraţiei electronice a O_2. Schema variaţiilor energiilor libere în decursul reducerii univalente a O_2 este prezentată în fig. 1.6.

Din fig. 1.6. se observă marea varietate a parametrilor termodinamici în cursul reducerii univalente a O_2, ceea ce explică necesitatea apariţiei formelor activate ale O_2. Din considerente energetice formarea radicalului

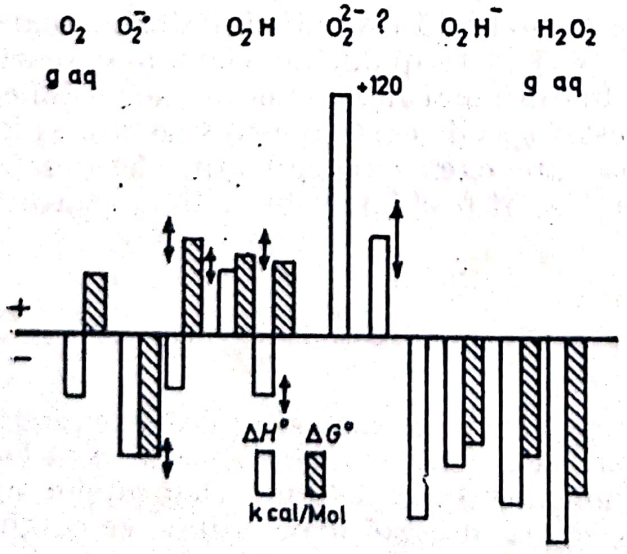


Fig. 1.6. Parametrii termodinamici ai unor forme active ale oxigenului. După Matkovics [48].

Scanned with OKEN Scanner

perhidroxi $HO_2^{\cdot}$ este nefavorabilă, implicînd diferenţe energetice prea mari [29]. În cursul reducerii complete a O_2 conform ecuaţiei generale (1), legătura O—O va fi scindată dar numai după un transfer de electroni [22]. Reducerea O_2 la H_2O are loc în multe procese chimice şi în mod obişnuit în procesele biochimice din organisme inclusiv formele active ale oxigenului: $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$ şi H_2O_2. Interacţiunea acestor specii reactive cu procesele biochimice va fi studiată în partea a II-a (Capitolul 7).

1.4. SUPEROXIDUL

Radicalul $O_2^{\cdot-}$, superoxid, apare în mod obişnuit în reducerea O_2 la H_2O (reacţia 2) şi energetic constituie o specie instabilă datorită potenţialului redox mic. $O_2^{\cdot-}$ are o viaţă foarte scurtă trecînd în H_2O_2 (reacţia 3). Această specie poate fi socotită ca un anion, o bază conjugată a unui acid slab $HO_2^{\cdot}$, ce are o valoare pK de 4,88. Electronul acceptat de O_2 intră pe unul din orbitalii π^*. Ca şi alţi anioni superoxidul formează legături ionice, dînd unele săruri stabile; KO_2 este o pulbere albă. Conversia spontană a $O_2^{\cdot-}$ în H_2O_2 şi O_2 are loc şi prin reacţii de dismutare

$$HO_2^{\cdot} + HO_2^{\cdot} \rightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad (6) \qquad k_2 = 7{,}6 \times 10^5\ M^{-1}s^{-1}$$

$$HO_2^{\cdot} + O_2^{\cdot-} \rightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad (7) \qquad k_2 = 8{,}5 \times 10^7\ M^{-1}s^{-1}$$

$$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad (8) \qquad k_2 = 1{,}0\ M^{-1}s^{-1}$$

Deoarece reacţia (7) este cea mai rapidă, dismutarea spontană va fi mai rapidă la pH 4,8, în prezenţa unor concentraţii echivalente de $HO_2^{\cdot}$ şi $O_2^{\cdot-}$. În schimb reacţia (8) este înceată şi dismutarea scade prin creşterea valorilor pH. Aşa se explică de ce organismele au trebuit să-şi dezvolte o cale de apărare reprezentată prin superoxid dismutaza (cap. 9.2). Procesul de dismutare a $O_2^{\cdot-}$ este foarte complex oferind cercetătorilor un cîmp larg de investigaţii şi pentru găsirea unei explicaţii s-a făcut apel la reacţia Haber-Weiss [32] de descompunere a H_2O_2 de către săruri de fier. Acest tip de reacţie este aplicat în procesele în care se produc radicali foarte reactivi ca $OH^{\cdot}$ rezultaţi din dismutarea $O_2^{\cdot-}$ şi a H_2O_2 mai ales în prezenţa unor catalizatori

$$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow OH^- + OH^{\cdot} + O_2 \qquad (9)$$

După toate probabilităţile reacţia Haber-Weiss scrisă conform ecuaţiei (9) constituie un mecanism generalizat. Din numeroasele aplicaţii citäm:

$$Fe^{3+} + O^{\cdot-} \rightarrow Fe^{2+} + O_2 \qquad (10)$$

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^{\cdot} \qquad (11)$$

reducerea complecşilor ferici de către $O_2^{\cdot-}$ (reacţia 10) şi bine-cunoscuta reacţie Fenton (reacţia 11).

Scanned with OKEN Scanner

Superoxidul, $O_2^{\cdot-}$, apare ca o specie reactivă intermediară în multe reacţii şi se pare că proprietăţile sale distructive se datoresc trecerii în singlet [46]. Atît $O_2^{\cdot-}$, cît şi alte specii reactive ca $OH^{\cdot}$ şi $HO_2^{\cdot}$ au fost identificaţi prin diferite procedee expuse în tabelul 1.1.

Tabelul 1.1

Identificarea superoxidului şi altor radicali ai oxigenului

Condiţii experimentale	Aparatură	Bibliografie
Reacţii chimice variate	Spectrofotometrie de masă	[19, 20, 24]
	Spectrofotometrie rapidă	[21, 54]
	Rezonanţă electronică de spin	[8, 72]
Radioliza apei	Modificări de conductivitate	[68]
	Flash-fotoliză	[10, 60]
Formare ozonide	Puls-radioliză	[56, 58]
Halogenuri alcaline	Fluorescenţă	[19, 62]
	Markeri de spin	[9]

Rezonanţa electronică de spin (RES) şi determinările combinate de flash$^-$ şi puls-radioliză sînt metodele cele mai utilizate, mai ales pentru studii de cinetică [18]. Au fost identificaţi şi alte specii intermediare ca O_2^{2-}, O_4^{2-} şi HO_5^{3-} cu caracter diamagnetic, pe cînd HO_3^{2-} şi $O_2^{\cdot-}$ sînt paramagnetici [43]. Şi în acest domeniu RES îşi găseşte o largă utilizare în compararea speciilor intermediare şi a influenţei mediului de reacţie. Radicalul superoxid pare să fie un intermediar obişnuit în toate procesele ce implică un transfer de un electron oxigenului. $O_2^{\cdot-}$ dispare cu o constantă de viteză de $1{,}7 \times 10^7\ M^{-1}s^{-1}$ la 25° [18]. Pentru o concentraţie iniţială de 0,1 mM, semi-viaţa $O_2^{\cdot-}$ este în jur de 0,6 ms, ceea ce este sub limita de rezoluţie a multor tehnici de măsurat. Folosind disproporţionarea (reacţia 8) mai slabă în mediu alcalin asociată cu tehnica de îngheţare rapidă pentru RES [13], Knowles [43] a fost primul care a obţinut un semnal RES caracteristic superoxidului.

Chimia superoxidului a putut fi studiată adecvat de-abia după ce s-a găsit o sursă de $O_2^{\cdot-}$ convenabilă. Prepararea soluţiilor stabile de potasiu superoxid, KO_2, în solvenţi organici a furnizat această sursă [76], mai ales că această substanţă a început să fie utilizată şi pe scară industrială ca sursă de oxigen, la primenirea aerului în mine, submarine, spitale şi cabine spaţiale. Superoxidul are potenţialul de acţiune al unui agent redox sau al unui nucleofil. Cu halogenuri alchilice aparent acţionează ca un agent nucleofil producînd hidroperoxizi [30, 39]. Mecanismul general propus este următorul:

$$O_2^{\cdot-} + RX \xrightarrow[H^+]{} ROO^{\cdot} + X^-, \qquad \text{în care RX este halogenura}$$

$$\underset{\text{(olefina)}}{R(-H)} + HO_2^{\cdot} + X^- \tag{12}$$

$$ROO^{\cdot} + O_2^{\cdot-} \rightarrow ROO^- + O_2 \tag{13}$$

$$ROO^- + RX \rightarrow ROOR + X^- \tag{14}$$

Interacţiunea $O_2^{\cdot-}$ cu compuşi aromatici deschide largi perspective de cercetare ţinînd seama de larga răspîndire a acestora. Deplasarea nucleofilă a ionului de halogen de către $O_2^{\cdot-}$ se produce în ciclul aromatic activat prin pierderea unui electron al unor substituenţi ca de exemplu grupări nitro. Astfel prin reacţia $O_2^{\cdot-}$ cu halogen-nitro(di)benzeni se obţin nitrofenolii respectivi, conform fig. 1.7 A [28].

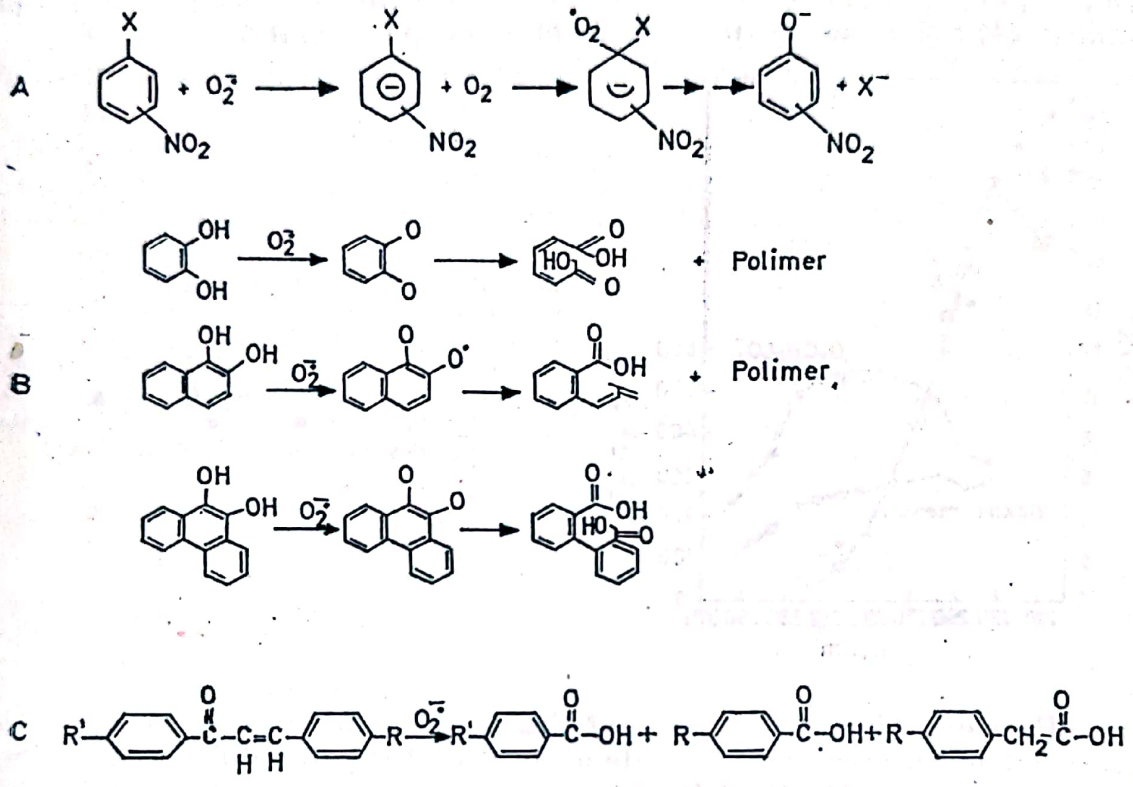


Fig. 1.7. Reacţiile unor compuşi aromatici cu radicalul superoxid, $O_2^{\cdot-}$. Explicaţii în text.

Adiţia difenolilor la soluţii organice de KO_2 produce radicali semichinonici puternic coloraţi cu semnale RES caracteristice [64]. În final se obţin polimeri sau acizi dicarboxilici (fig. 1.7 B). Reacţia aceasta aduce noi informaţii asupra oxidării catecolaminelor pe cale enzimatică.

Prin reacţia chalconelor cu KO_2 se produce o scindare oxidativă (fig. 1.7 C) datorită transferului unui electron de la $O_2^{\cdot-}$ la sistemul enonic al chalconelor [63]. De asemenea benzaldehida şi fenilacetaldehida sînt uşor oxidate de KO_2 în acizii corespunzători [63].

Compuşii de tip RH_2 sau RH formează radicali prin pierderea unui H, care fiind în stare activată reacţionează cu O_2 formînd $RHO_2^{\cdot}$ sau $O_2^{\cdot-}$:

$$RH_2 + OH^{\cdot} \rightarrow RH + H_2O \qquad (15)$$

$$RH + O_2 \rightarrow RHO_2^{\cdot} \text{ sau } R^{\cdot} + H^+ + O_2^{\cdot-} \qquad (16)$$

În prezenţa alcoolilor inferiori (metanol, etanol) randamentul superoxidului creşte mult prin formarea adiţională a radicalilor peroxi $RHO_2^{\cdot}$

și hidroxil OH· ([18]. Radicalii peroxi alcoolici se descompun ușor în mediu alcalin furnizînd un supliment de superoxid :

$$RHO_2^{\cdot}\ (\text{alcool}) \xrightarrow{OH^-} R + H^+ + O_2^{\cdot-} \qquad (17)$$

Superoxidul a mai fost pus în evidență în cursul oxidării hidroxilaminei [45], acidului dihidroxifumaric [31], hemoglobinei [28, 31], bilirubinei [47] și în multe procese biochimice (Capitolul 7).

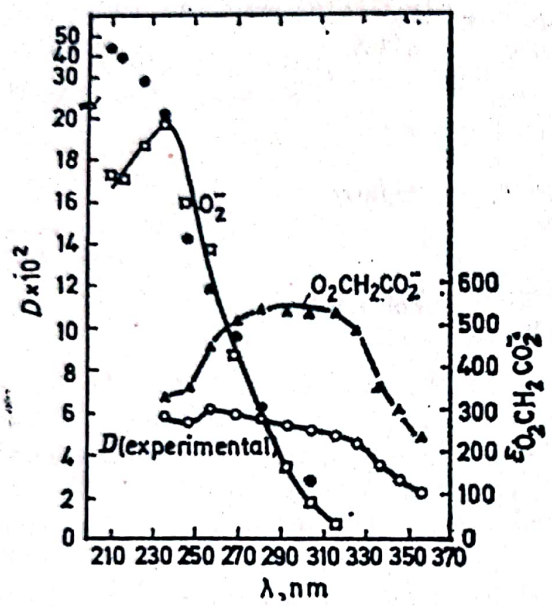


Fig. 1.8. Spectrul $\cdot OOCH_2COO^-$ și $O_2^{\cdot-}$ din soluții de acetat și formiat de sodiu 0,01 *M* la 1 atm amestec O_2(24%) și N_2O (76%) la *p*H 8,0 obținut prin puls radioliză [1] : experimental ○——○, teoretic ▲——▲ acetat, □——□ (formiat), ● ——● absorbția rămasă după descompunerea $\cdot OOCH_2COO^-$

Prin experimente de puls-radioliză combinate cu spectrofotometrie s-a reușit măsurarea spectrului de absorbție al superoxidului și a radicalului peroxiacetat $O_2CH_2COO^-$ [33], cît și cinetica și constantele de descompunere. Pentru $O_2^{\cdot-}$ s-a determinat un coeficient de extincție molar $\varepsilon_{O_2^{\cdot-}}^{236} = 1920\ M^{-1}\ cm^{-1}$ la 236 nm. Peroxizii și radicalii peroxi produc în general $O_2^{\cdot-}$ mai ales în prezența altor radicali ca e_{aq}^-, OH· [36, 61].

Trebuie menționat că reacțiile superoxidului diferă mult într-un sistem omogen și la o interfață. De exemplu prin iradierea oxidului de zinc solid se produce H_2O_2 în concentrație mare [49], iar superoxidul absorbit pe un catalizator din V_2O_5 reacționează cu etilena chiar la 25°C [73]. În general oxidările pe un suport din metale duc la un randament mult mai mare comparativ cu sistemele omogene. Studiul oxidărilor în sisteme heterogene încă este puțin dezvoltat, atît practic, cît și teoretic. Menționăm peroxidarea cu viteză mare a lipidelor absorbite pe 2,5-difenilfuran în cursul căreia au fost detectate $O_2^{\cdot-}$ și $^1O_2$ [69].

1.5. RADICALUL HIDROXIL

În cursul reducerii O_2 la H_2O mai apare o formă activă a oxigenului, radicalul hidroxil, OH· (reacția 5). O altă sursă de OH· este furnizată de reacția Haber-Weiss aplicată în procesul de dismutare al $O_2^{\cdot-}$ (reacția 9)

Scanned with OKEN Scanner

și în reacția Fenton (reacția 11). După cum am amintit, deși reacția Haber-Weiss este termodinamic posibilă [46], condițiile experimentale dificile au întîrziat mult studiile întreprinse de mulți cercetători [34, 51]. Se admite că dismutarea superoxidului are loc destul de încet și de aceea în organismele vii această reacție este catalizată enzimatic sau după cum a arătat recent Halliwell prin intermediul fierului complexat [33], după mecanisme similare reacțiilor 10 și 11.

Radicalul hidroxil poate fi detectat chimic, prin capacitatea de a hidroxila compuși aromatici [34], cît și prin spectrometrie de masă [24].

O altă sursă de radical hidroxil este furnizată de radioliza apei, proces complex în cursul căruia se dezvoltă o gamă largă de radicali liberi, specii active ale oxigenului și e^-_{aq}, $H^\cdot$, $OH^\cdot$, H_2O_2, H_3O^+, HO_2^- [5]. După Nilsson [53] randamentul producției de $OH^\cdot$ rezultat din radioliza apei depinde de prezența în anumite concentrații a H_2O_2 (fig. 1.9).

Din fig. 1.9. se poate observa comparativ randamentul peroxidării naftalinei prin trei surse generatoare de $OH^\cdot$, cît și efectul concentrației H_2O_2. Radicalul hidroxil constituie unul din cei mai puternici agenți de oxidare capabil să atace molecule organice de tipul benzenului; în acest caz constanta de reacție bimoleculară este 5×10^9 $M^{-1}s^{-1}$ [52].

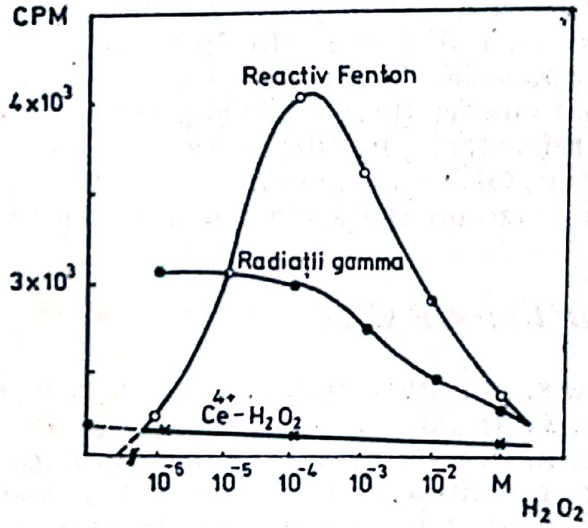


Fig. 1.9. Oxidarea naftalinei de către Reactivul Fenton (2×10^{-4} M Fe^{2+}), radiații gamma Co^{60} și cu sistemul $Ce^{4+} - H_2O_2$ în prezența unor concentrații variate de H_2O_2. După Nilsson [53].

Radicalul hidroxil reacționează cu molecule organice după următorul mecanism cuprins în ecuațiile (15) și (16), demonstrat pentru ciclopentan [38], metanol [60] și 2-propanol [1], evidențiindu-se totodată apariția radicalului peroxi $RHOO^\cdot$. Acest radical se descompune după o reacție de ordinul II cu o constantă de viteză de $6{,}5 \times 10^8$ $M^{-1}s^{-1}$ (34) de tipul reacției (17) sau

$$2\ RHOO^\cdot \rightarrow 2\ R^\cdot + H_2O_2 + O_2 \qquad (18)$$

$$RHOO^\cdot \rightarrow R^\cdot + HOO^\cdot. \qquad (19)$$

Prin aceste apariții și descompuneri de specii reactive se asigură propagarea unei reacții în lanț ce duce la degradarea moleculelor organice,

Scanned with OKEN Scanner

bineînţeles dacă condiţiile experimentale o permit. Aceste condiţii cuprind factori fizici (căldură, lumină, umezeală) şi chimici (prooxidanţi şi antioxidanţi) ce vor fi descrişi în următoarele capitole.

În 1934, Haber şi Weiss au fost primii care au propus radicalul hidroxil ca adevăratul oxidant în unele sisteme cum ar fi reactivul Fenton [32]. Acest reactiv format dintr-o sare de fer şi H_2O_2 a fost schematizat în ecuaţiile (10) şi (11), dar în realitate este mult mai complex. Marea capacitate oxidantă este indicată şi de constantele de viteză a unor reacţii parţiale cunoscute [77]:

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \xrightarrow{k_1} Fe^{3+} + OH^- + OH\cdot \qquad k_1 = 76\ \text{l/mol} \cdot \text{s}$$

$$OH\cdot + Fe^{2+} \xrightarrow{k_2} Fe^{3+} + OH^- \qquad k_2 = 3 \times 10^8\ \text{l/mol} \cdot \text{s}$$

$$OH\cdot + RH \xrightarrow{k_3} R\cdot + H_2O \qquad k_3 = 10^7 - 10^{10}\ \text{l/mol} \cdot \text{s}$$

$$R\cdot + Fe^{3+} \longrightarrow Fe^{2+} + \text{produse (dimeri)}$$

Înrudit cu reactivul Fenton, dar mai slab, este sistemul propus de Halliwell [34] format din ioni de Fe complexaţi cu EDTA şi H_2O_2. Un al treilea sistem generator de radical hidroxil este cel propus de Udenfriend [75] format din Fe^{2+}, acid ascorbic şi EDTA (acid dietilen aminotetracetic). Toate aceste trei sisteme generatoare de $OH\cdot$ au în comun o sare de fer (bivalentă) şi peroxid de hidrogen (H_2O_2). De asemenea aceste trei sisteme, în diferite variante, pot exista şi în organismele vii, pot produce $OH\cdot$ cu capacitate oxidantă foarte puternică şi faţă de care nu există sisteme de apărare aşa cum sînt pentru H_2O_2 şi O_2^- [26].

BIBLIOGRAFIE

1. S. ABRAMOVITCH, J. RABANI, *J. Phys. Chem.*, **80**, 1562 (1976).
2. M. ANBAR, P. NETA, *Int. J. Appl. Rad. Isotopes*, **16**, 227 (1965).
3. R. M. ARNESON, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **136**, 352 (1970).
4. J. S. ARNOLD, E. A. OGRYZOLO, *Photochem. Photobiol.*, **6**, 693 (1965).
5. P. AUSLOS, „Fundamentals Processes in Radiation Chemistry" New York, J. Wiley, 1968 cap. I.
6. R. M. BADGER, A. C. WRIGHT, R. F. WHITLOCK, *J. Chem. Phys.*, **43**, 4345 (1965).
7. P. C. BARRELL, P. M. BARRELL, *Chem. Phys. Lett.*, **51**, 300 (1977).
8. J. E. BENNETT, B. MILE, A. THOMAS, *Trans. Faraday Soc.*, **64**, 3200 (1968).
9. G. R. BERETTNER, L. W. OBERLEY, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **83**, 69 (1978).
10. B. H. BIELSKI, H. A. SCHWARTZ, *J. Phys. Chem.*, **72**, 164 (1968).
11. J. BLAND, B. CRANEY, *Tetrahedron Lett.*, **197**, 4041 (1974).
12. W. BORS, M. SARAN, C. MICHEL, *Current Top. Rad. Res. Quart.*, **9**, 247 (1974).
13. R. C. BRAY, *Biochem. J.*, **81**, 189 (1961).
14. W. H. CHILDS, R. MECKLE, *Z. Physik*, **68**, 344 (1931).
15. I. D. CLARK, R. P. WAYNE, *Mol. Phys.* **18**, 523 (1970).
16. E. J. COREY, W. C. TAYLOR, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 3881 (1964).
17. G. CZAPSKI, L. M. DORFMAN, *J. Phys. Chem.*, **68**, 1568 (1964).
18. G. CZAPSKI, L. M. DORFMAN, *J. Phys. Chem.*, **71**, 384 (1967).

Scanned with OKEN Scanner

19. G. CZAPSKI, *Ann. Rev. Phys. Chem.*, 171 (1971).
20. L. S. DENIMA, J. M. SALHANY, *J. Biol. Chem.*, **252**, 1226 (1977).
21. J. DUFFAY, *Ann. Astrophys.*, **5**, 93 (1942).
22. S. FALLAH, *Angew. Chem.*, **6**, 6 (1967).
23. M. H. FISCH, J. C. GRAMAIN, J. A. OELSEN, *Chem. Commun.*, 663 (1971).
24. S. N. FONER, R. L. HUDSON, *J. Chem. Phys.*, **23**, 1975 (1955).
25. C. S. FOOTE in „Free Radicals in Biology" edit. W. A. Pryor, vol. 2, Academic Press, New York, 1976 p. 85.
26. I. FRIDOVICH, *Annu. Rev. Biochem.*, **44**, 147 (1975).
27. I. FRIDOVICH, *Bioscience*, **27**, 462 (1977).
28. A. FRIMER, I. ROSENTHAL, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 2809 (1976).
29. P. GEORGE, „Oxidases and related redox systems" vol. I, J. Wiley, London 1965 p. 3.
30. M. J. GIBIAN, T. UNGERMANN, *J. Org. Chem.*, **41**, 2500 (1976).
31. B. GOLDBERG, A. STERN, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **178**, 218 (1977).
32. F. HABER, J. WEISS, *Proc. Roy. Soc. London* Ser. A **147**, 332 (1934).
33. B. HALLIWELL, S. AHLUWALIA, *Biochem. J.* **153**, 513 (1976).
34. B. HALLIWELL, *FEBS Lett.*, **92**, 321 (1978).
35. J. W. HASTINGS, T. WILSON, *Photochem., Photobiol.*, **23**, 461 (1976).
36. E. HAYON, M. SIMIC, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 6681 (1973).
37. R. HIATT in „Organic Peroxides" edit. D. Swern, J. Wiley, New York, 1971, vol. 2, p. 1.
38. Y. ILAN, J. RABANI, A. HENGLEIN, *J. Phys. Chem.*, **80**, 1558 (1976).
39. R. A. JOHNSON, E. G. NIDY, *J. Org. Chem.*, **40**, 1680 (1975).
40. E. W. KELLOGG, I. FRIDOVICH, *J. Biol. Chem.*, **250**, 8812 (1975).
41. A. U. KHAN, *Science*, **168**, 476 (1970).
42. M. M. KING, E. K. LAI, P. B. MC COY, *J. Biol. Chem.*, **250**, 6496 (1975).
43. P. F. KNOWLES, J. F. GIBSON, F. M. PICK, R. C. BRAY, *Biochem. J.*, **111**, 53 (1969).
44. E. KOCH, *Tetrahedron Lett.*, **24**, 6295 (1968).
45. J. KONO, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **186**, 189 (1978).
46. W. H. KOPPENOL, J. BUTLER, *FEBS Lett.*, **83**, 1 (1977).
47. D. A. LIGHTNER, Y. T. PARK, *Experientia*, **34**, 555 (1978).
48. I. B. MATKOVICS, *Acta Univ. Lodz*, **16**, 103 (1977).
49. M. C. MARKHAM, M. C. HANNAN, S. W. EVANS, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 820 (1954).
50. E. A. MAYEDA, A. J. BARD, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 6223 (1973).
51. P. M. MERKEL, R. NILSSON, D. R. KEARNS, *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 1030 (1972).
52. R. N. MOORE, R. V. LAWRENCE, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 1438 (1958).
53. R. NILLSSON, *Thesis*, University of Stockholm, 1969.
54. R. G. NORRISH, G. PORTER, *Proc. Roy. Soc.* London Ser. A, **210**, 439 (1952).
55. E. A. OGRYZOLO, B. A. TRUSH, *Chim. Phys. Lett.*, **23**, 34 (1973).
56. P. PAGSBERG, H. CHRISTIANSEN, J. RABANI, *J. Phys. Chem.*, **73**, 1029 (1969).
57. G. J. MCPLUNE, J. A. FEE, *FEBS Lett.*, **67**, 294 (1976).
58. J. N. PITTS, A. U. KHAN, *Environ. Sci. Technol.*, **3**, 241 (1969).
59. J. RABANI, M. S. MATHESON, *J. Phys. Chem.*, **70**, 761 (1966).
60. J. RABANI, D. K. ROTH, A. HENGLEIN, *J. Phys. Chem.*, **78**, 2089 (1974).
61. J. RABANI, M. PICK, M. SIMIC, *J. Phys. Chem.*, **78**, 1049 (1974).
62. K. ROLFE, R. F. LIPSETT, W. J. KING, *Phys. Rev.*, **123**, 442 (1961).
63. I. ROSENTHAL, A. FRIMER, *Tetrahedron Lett.*, **32**, 2805 (1976).
64. H. R. ROWLS, P. J. VAN SANTEN, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **47**, 121 (1970).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 2

PROCESUL DE PEROXIDARE

2.1. AUTOOXIDARE ŞI PEROXIDARE

Aşa cum s-a arătat în primul capitol, datorită unei configuraţii electronice deosebite oxigenul molecular posedă o inerţie chimică relativă, care poate fi învinsă în urma activării în anumite condiţii şi producerii unor specii înalt reactive cum sînt singlet, superoxid, hidroxil. Datorită noilor achiziţii în domeniul activării O_2, procesul de peroxidare aşa cum a fost studiat în anii 1950—1960 trebuie revizuit.

Autooxidarea, în concepţia cea mai largă, de oxidare cu oxigenul atmosferic, cuprinde un domeniu foarte vast, din care peroxidarea constituie doar o parte. Pentru a preveni autooxidarea numeroaselor substanţe organice era necesară cunoaşterea mecanismului acestui proces, mai ales în domeniul grăsimilor, unde autooxidarea era foarte evidentă. De aceea încă din secolul trecut s-au emis diferite ipoteze asupra mecanismului autooxidării menţionînd pe Saussure în 1820 [40], Bach în 1897 [3] ce susţineau adiţia O_2 la o dublă legătură. Prima dovadă a peroxidării ca etapă iniţială în autooxidare a constituit-o izolarea unui hidroperoxid al ciclohexenei de către Stephens în 1928 [43] prin fotooxidare. De-abia în urma necesităţilor impuse de cel de al II-lea război mondial s-au reluat lucrările, în special ale lui Farmer şi colaboratorilor [16, 17] care au stabilit că autooxidarea grăsimilor nesaturate, a olefinelor, se produce printr-o reacţie în lanţ ce implică adiţia unei molecule de oxigen la un atom de carbon adiacent unei duble legături pentru a forma un hidroperoxid avînd o dublă legătură intactă:

$$-CH=CH-CH_2-CH=CH- \xrightarrow{O_2} -CH=CH-\underset{\displaystyle OOH}{\underset{|}{CH}}-CH=$$

$$=CH- \xrightarrow{O_2} -CH=CH-\underset{\displaystyle OOH}{\underset{|}{CH}}-\underset{\displaystyle OOH}{\underset{|}{CH}}-CH_2-$$

Deci peroxidarea constituie etapa iniţială şi principală a mecanismului autooxidării, dar care în urma numeroaselor lucrări ce apar devine mai complex. Implicarea radicalilor liberi în diferite etape ale peroxidării [17, 50] a complicat şi mai mult acest proces foarte complex.

Datorită structurii electronice particulare, O_2 are o comportare aparte, deoarece acceptarea unui electron va favoriza intrarea unui al doilea electron. În consecinţă, în peroxidare, O_2 va fi un acceptor de electroni mai bun în stare activată decît în stare fundamentală şi auto-

Scanned with OKEN Scanner

oxidările pot fi accelerate prin prezența unor donori de electroni cum sînt *o*-difenoli în cantități foarte mici.

Studiul oxidării grăsimilor (impus de necesități economice) a furnizat substratul cel mai adecvat. Astfel s-a observat că viteza de oxidare a sistemelor polinesaturate cu punți metilen este mult mai mare decît în sistemele monoetenice din cauza activării unei grupe metilen între 2 duble legături adiacente. Această dublă activare mărește viteza de oxidare de 20—40 ori demonstrînd că acizii polinesaturați sînt sursa principală a rîncezirii oxidative a grăsimilor. Cînd uleiuri sau grăsimi ce conțin acid linoleic sau alți acizi grași nesaturați sînt autooxidate, se produce o conjugare dien măsurabilă printr-un maxim de absorbție la 2340 Å, simultan cu formarea peroxizilor. Studii spectrofotometrice combinate cu separări cromatografice [42, 50] au evidențiat în produșii finali atît peroxizi, dar și alți produși rezultați din izomerizări sau ramificări. Procesul de autooxidare decurge după tipul reacțiilor cu producere de radicali liberi: inițierea unei reacții în lanț, propagarea reacției de-a lungul lanțului și reacții de terminare. Reacția în lanț poate fi inițiată prin atacul oricărui radical liber asupra unui substrat favorabil; cei mai potriviți fiind radicalii formați prin descompunerea unui peroxid aflat în compoziția substratului ca impuritate. Astfel, cu cît decurge mai departe autooxidarea, aceasta își generează propriul său catalizator — peroxizii. Natura autocatalitică a reacției în lanț poate fi oprită prin prezența unor antioxidanți sau prin ciocnirea a 2 radicali:

$$R\cdot + R\cdot \rightarrow RR \text{ sau } R\cdot + ROO\cdot \rightarrow ROOR$$

Desigur, cu cît substanțele sînt mai complexe structural, cu atît procesul se complică. Compușii saturați sînt mult mai rezistenți la autooxidare. Hidrocarburile normale saturate se autooxidează lent, începînd cu temperaturi peste 160° C, procesul crescînd cu lungimea catenei. Atacul oxidativ este aleator, izolîndu-se hidroperoxizi ca produși primari ce se descompun cu formare de fragmente ale catenei inițiale sau un amestec de produși secundari cum sînt acizi, cetone, alcooli (fig. 2.1).

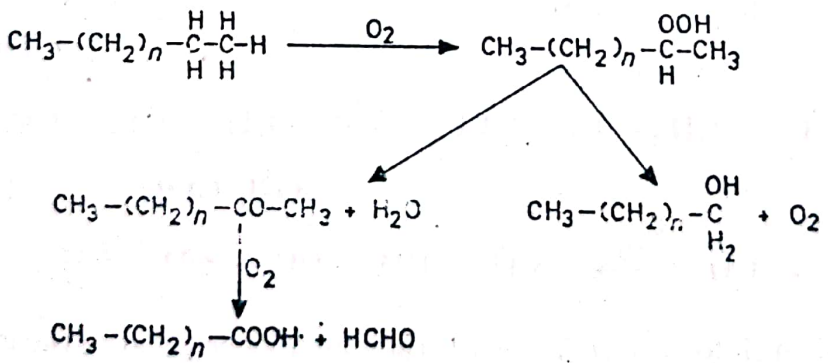


Fig. 2.1. Mecanismul autooxidării unor hidrocarburi saturate și formarea produșilor finali (41).

Aldehidele, cetonele și acizii rezultați suferă în continuare oxidări cu formare în final a unor amestecuri complexe de polimeri, produși intermediari ai autooxidării și hidroperoxizi încă nedescompuși. Acest amestec final conține proporții calitative și cantitative impredictibile greu de măsurat.

Scanned with OKEN Scanner

În general s-a observat că cu cît un compus este mai purificat, cu atît este mai rezistent la autooxidare şi că acizii sînt mai autooxidabili decît esterii respectivi probabil datorită participării grupării carbonil la descompunerea hidroperoxizilor [35].

Complexitatea peroxidării şi implicit a autooxidării a oferit subiect de studiu multor cercetători acumulîndu-se un vast material informativ, din care vom expune doar caracteristicile principale, oferind doritorilor citarea unor monografii [18, 48, 50]. Deşi chimic procesul peroxidării este cunoscut, aplicaţiile practice industriale încă sînt incomplet studiate, iar implicaţiile biologice şi medicale abia au început să fie luate în consideraţie.

2.2. CINETICA PEROXIDĂRII

Autooxidarea poate fi prezentată ca o reacţie în lanţ de tipul:

$$R\cdot + O_2 \rightarrow ROO\cdot,\ ROO\cdot + RH \rightarrow ROOH + R\cdot$$

care se propagă datorită unor radicali liberi ce sînt regeneraţi continuu. În acest caz, reacţia binecunoscută $d(AB)/dt = K(A)(B)$ nu se mai aplică şi trebuesc luate în consideraţie etapele procesului.

A. INIŢIEREA este prima etapă a peroxidării şi constă în producerea de radicali liberi derivaţi din substanţa, R, ce suferă peroxidarea. Aceasta este etapa cea mai importantă deoarece procesul de peroxidare odată început este greu de controlat. Apariţia unor radicali liberi într-o substanţă organică se datoreşte unuia sau mai multor factori externi (temperatură ridicată, umezeală, presiune oxigen) sau interni (impurităţi uşor oxidabile, de exemplu compuşi aromatici, difenoli). Lumina, radiaţiile ionizante, ultraviolete mai ales, sînt de asemenea un factor extern favorizant. Aceşti factori externi, în anumite condiţii favorabile de la caz la caz produc activarea O_2 şi dezvoltarea unor specii reactive ($^1O_2$, $O_2^{\cdot-}$, $OH\cdot$) care deşi au o viaţă scurtă pot iniţia o reacţie la un loc critic al unei macromolecule sau cu o impuritate uşor oxidabilă. Deşi radicalii oxigenului pot apare ocazional, reacţiile care le declanşează (capitolul 1) sînt suficiente să iniţieze producerea unor noi radicali liberi din substanţa organică studiată (RH). O primă reacţie, exceptînd cele de activare a O_2, ar fi o scindare homolitică de forma:

$$RH \xrightarrow{\text{iniţiator}} R\cdot + H^+$$

Reacţia este puternic endotermă şi are loc numai printr-un şoc molecular la un nivel înalt energetic. O temperatură peste 40°C şi prezenţa O_2 sînt esenţiale pentru apariţia radicalilor şi a peroxizilor. Descompunerea unor peroxizi formează însă iniţiatorul cel mai eficient:

$$2\ ROOH \xrightarrow{O_2} R\cdot + ROO\cdot \quad (k_1) \qquad (1)$$

$$ROOH \xrightarrow{h\nu} R\cdot + HO_2^{\cdot} \quad (k_7) \qquad (2)$$

(denumirea constantelor de viteză s-a făcut conform propunerilor mai vechi [16] reluate şi de alţi autori [5, 35].

Scanned with OKEN Scanner

B. PROPAGAREA este a doua etapă a peroxidării caracterizată prin continuarea formării radicalilor liberi, în special a peroxizilor derivaţi din substanţa în curs de oxidare. Reacţiile mai importante sînt:

$$R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot} \quad (k_2) \tag{3}$$

$$ROO^{\cdot} + RH \rightarrow ROOH + R^{\cdot} \quad (k_3) \tag{4}$$

Reacţia (3) poate fi foarte rapidă, aşa cum este cazul peroxidării ciclohexenei, în care k_2 este de ordinul 10^7 moli/l/s^{-1}. În schimb, reacţia (4) este mai lentă şi mai selectivă avînd loc în regiunea unor legături C—H slabe (benzil sau alil) sau în puncte de densitate electronică mare (hidrogeni în grupări amino sau eter). În sisteme nesaturate, cum ar fi autooxidarea stirenului [27], se produce o adiţie la dubla legătură

$$ROO^{\cdot} + CH_2 = CHC_6H_5 \rightarrow ROOCH_2CH_2C_6H_5$$

şi o competiţie între reacţiile (3) şi (4).

În cursul radiolizei apei sub acţiunea radiaţiilor ionizante se formează peroxid de hidrogen în urma cuplării radicalilor hidroxil [49]:

$$2\ OH^{\cdot} \rightarrow H_2O_2$$

H_2O_2 odată formată poate iniţia şi produce introducerea grupării peroxi în molecule organice prin procese S_N2 ca de exemplu:

$$n\text{-}C_4H_9OSO_2CH_3 + HOO^- \rightarrow C_4H_9OOH + CH_3SO_3^-$$

sau prin adiţia reversibilă la grupări carbonil:

$$RCHO + H_2O_2 \rightarrow RC(OH)HOOH \xrightarrow{R'OOH} RCH(OOR') \xrightarrow{R'OOH} RCH(OOR')_2 \rightarrow$$

ce duc la propagarea peroxidării într-o substanţă (exemplu polimer).

Reacţia cea mai lentă, de care depinde viteza întregului proces, este formarea hidroperoxidului legat — O —**O** — şi care necesită un aport mai mic de energie decît scindarea unor legături de tip C —C sau C =**O**. În fig. 2.2. sînt prezentate posibilităţile multiple de scindare a grupării peroxi şi energia unor legături:

C. TERMINAREA constituie a treia etapă a peroxidării şi se datoreşte unor reacţii între diferiţi radicali ce produc compuşi inactivi:

$$R^{\cdot} + R^{\cdot} \rightarrow R - R \quad (k_4) \tag{5}$$

$$R^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightarrow \text{produşi inactivi} \quad (k_5) \tag{6}$$

$$ROO^{\cdot} + ROO^{\cdot} \rightarrow \text{produşi inactivi} \quad (k_6) \tag{7}$$

Scanned with OKEN Scanner

Şi în cazul acestei etape reacţiile sînt destul de imprevizibile, condiţiile locale ale agenţilor fizico-chimici, prezenţa unor pro-oxidanţi sau a unor antioxidanţi pot influenţa extrem de mult.

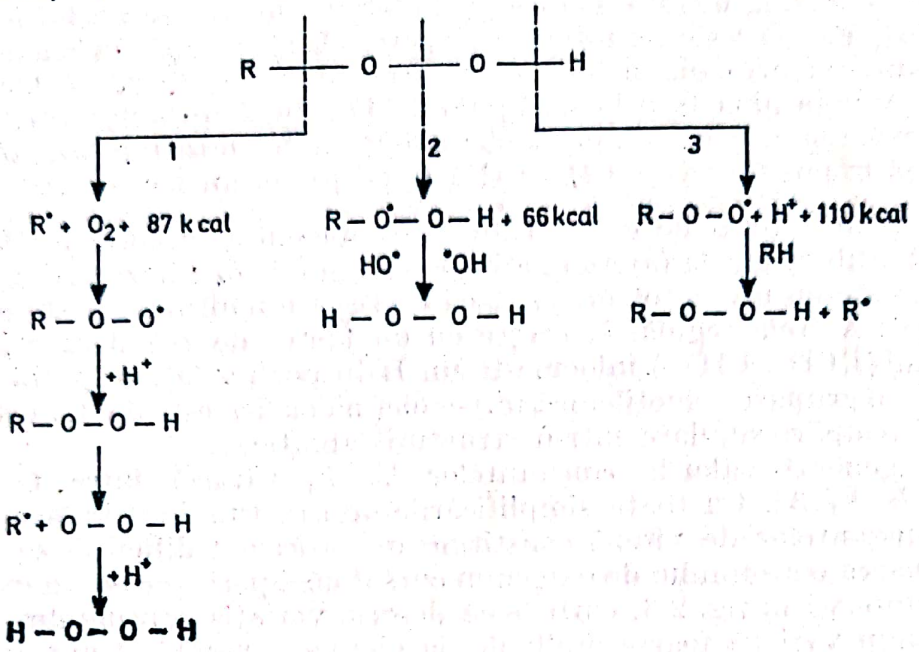


Fig. 2.2. Formarea peroxizilor şi a radicalilor liberi rezultaţi în urma descompunerii unui hidroperoxid

Pentru un proces atît de complex şi tratarea lui cinetică va fi de asemenea dificilă şi complicată. Totuşi există numeroase studii cinetice din care prezentăm un rezumat:

Notînd cu RH substanţa iniţială, r_i viteza producerii radicalilor, măsurînd consumul de oxigen şi apariţia unor peroxizi, se poate aprecia că viteza autooxidării este legată de coeficienţii de viteză pentru diferitele reacţii parţiale mai sus prezentate ($k_1 - k_7$):

$$\frac{-d[O_2]}{dt} = r_i^{1/2} \frac{k_3}{k_6}[RH] \frac{k_3(k_6)^{1/2}[O_2]}{k_3(k_4)^{1/2}[RH] + k_2(k_6)^{1/2}[O_2] + (k_4 k_6 r_i)^{1/2}}; \quad (8)$$

pentru lanţuri mai mari de 10 termenul $(k_4 k_6 r_i)^{1/2}$ devine neglijabil. Eficienţa cu care decurg etapele de iniţiere (k_1) şi cea de terminare (k_6) diferă cu natura compusului, reacţia (4) trebuie privită ca limitînd procesul de autooxidare. Ţinînd seama că producerea de radicali liberi condiţionează procesul de peroxidare, se pot aplica condiţiile stării staţionare şi se admite

$$d[R\cdot]/dt = r_i - k_2[R\cdot][O_2] + [ROO\cdot][RH] \quad (9)$$

$$d[ROO\cdot]/dt = k_2[RH][O_2] - k_3[ROO\cdot][RH] - k_4[ROO\cdot]^2 \quad (10)$$

Starea staţionară implică ca $d[R\cdot]/dt = 0$ şi $d[ROO\cdot]/dt = 0$
Prin adunarea reacţiilor (8) şi (9) se obţine $r_i - k_4[ROO\cdot]^2 = 0$ iar $[ROO\cdot] = (r_i/k_4)^{1/2}$, de unde viteza formării hidroperoxizilor

$$d[ROOH]/dt = (r_i/k_4)^{1/2}(k_3[RH]) \quad (11)$$

Scanned with OKEN Scanner

Această relaţie mult simplificată verifică satisfăcător datele experimentale cu privire la ordinul întîi al peroxidării globale faţă de substrat. Un grafic folosind $d[ROOH]/dt$ faţă de $[RH]$ permite evaluarea raportului $(k_3/k_4)^{1/2}$. Constantele k_3 şi k_4 pot fi separate prin metoda fotochimică a lui Bateman şi Gee [5]. Factorii sterici intervin în peroxidare şi după Bateman şi Gee [6], în autooxidarea olefinelor sînt de ordinul 10^{-2}—10^{-5} dacă energia de activare ajunge pînă la 5 kcal. Bolland [11] după un studiu temeinic a emis cîteva reguli care se aplică olefinelor. Astfel poziţiile (*a*), (*b*) şi (*c*) corespund la poziţia $\underset{a}{CH_3}-\underset{b}{CH}=\underset{c}{CH_2}$; k_3 creşte cu un factor $3{,}3^n$, în care n este numărul total de grupări alchil ce înlocuiesc atomii de H în (*a*) şi/sau (*c*). Substituiri la (*b*) nu modifică constantele de viteză. În al doilea rînd k_3 creşte cu un factor de 23 dacă o grupare fenil înlocuieşte un H în poziţia (*a*). A treia regulă, k_3 creşte cu un factor de 107 dacă o grupare alch-1-enil (RCH=CH—) înlocuieşte un H în poziţia (*a*). A patra regulă, k_3 pentru o grupare α-metilenică într-o olefină ciclică este de 1,7 ori valoarea unei grupări similare într-o structură alifatică.

În general valorile constantelor k_2—k_6 variază între 1—$50 \cdot 10^6$ $(moli/l)^{-1}s^{-1}$ [13]. Cu toate simplificările aduse studiilor cinetice, măsurarea constantelor de viteză constituie un procedeu dificil şi se preferă determinarea consumului de oxigen în cursul unei perioade de timp. După cum se observă în fig. 2.3. curbele ce descriu variaţia consumului de oxigen în timp variază foarte mult de la olefina studiată şi numai în fig. 2.3. a se observă clar perioada latentă de inducţie, partea liniară (propagarea) şi tendinţa de plafonare (terminare). Determinările experimentale au demonstrat o relaţie aproape liniară între viteza globală a procesului şi consumul de oxigen pentru prima parte a curbei [12]. Deoarece în

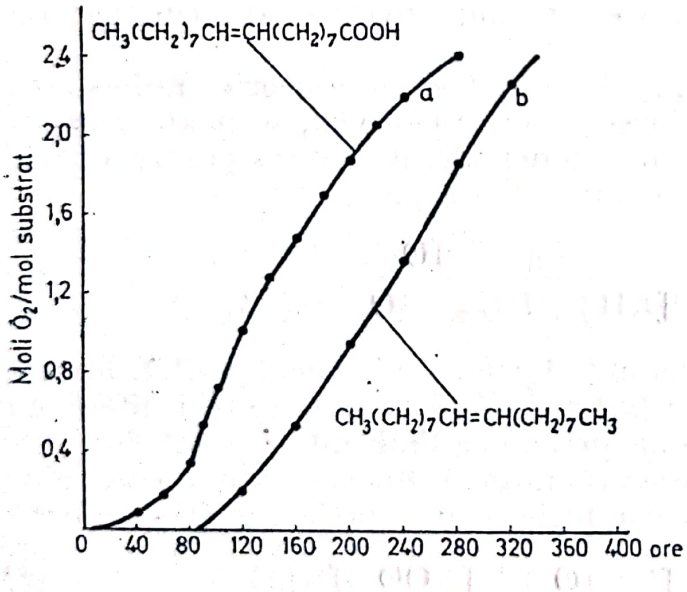


Fig. 2.3. Cinetica autooxidării unor olefine; după [29]

prima parte a curbei peroxizii sînt singurii produşi ai autooxidării (R· sînt mult mai puţini decît ROO·), viteza peroxidării este proporţională cu patratul concentraţiei hidroperoxizilor şi ecuaţiile (8) şi (9) pot fi reduse la

$$r_i = e_i k_i [ROOH]^2, \qquad (12)$$

în care k_i reprezintă constanta de viteză a reacţiei bimoleculare şi e_i este eficienţa producerii radicalilor. Tratarea cinetică prezentată presu-

Scanned with OKEN Scanner

pune că O_2 absorbit în timpul autooxidării se regăseşte sub formă de peroxid. Aceasta este valabil doar pentru prima parte a procesului şi nu mai corespunde realităţii cu cît propagarea procesului atinge maximul. Tobolsky [45] admite că la timpul în care peroxizii au atins concentraţia maximă, viteza de descompunere egalează viteza lor de formare. Această concentraţie maximă

$$[ROOH]_{max} = k_3 k_t^{-1} k_6^{-1} [RH] \qquad (13)$$

se produce în partea liniară a curbei de autooxidare (fig. 2.3). Ecuaţia (13) explică observaţiile empirice după care randamentul peroxizilor din diferite hidrocarburi depind în special de k_3, adică de uşurinţa scoaterii unui H din molecula substratului. În acest caz consumul de O_2 devine :

$$-\left(\frac{d[O_2]}{dt}\right)_{max} = k_3^2 k_6^{-1} [RH]^2. \qquad (14)$$

Viteza absorbţiei O_2 în porţiunea de viteză maximă a curbei de autooxidare este deci dependentă de pătratul vitezei de scoatere a hidrogenului şi independent de viteza de iniţiere. După cum se observă din fig. 2.4.A, extrapolarea curbelor la absorbţia O_2 zero dă o valoare pozitivă pe axa r. Aceasta indică că la valori foarte mici ale absorbţiei O_2 descompunerea hidroperoxizilor se schimbă din ordinul doi la întîi [8], mai ales la concentraţii mici de peroxid. Această comportare a fost verificată şi în cazul altor autooxidări. De exemplu Grant şi Tipper [21] au găsit că în cazul difenilmetanului viteza autooxidării este proporţională cu rădăcina patrată a oxigenului absorbit (fig. 2.4.B).

Analiza oxidării lipidelor din alimente a arătat competiţii între diferitele lipide prezente cu efect inhibitor. Russel [38] a observat că adăugarea

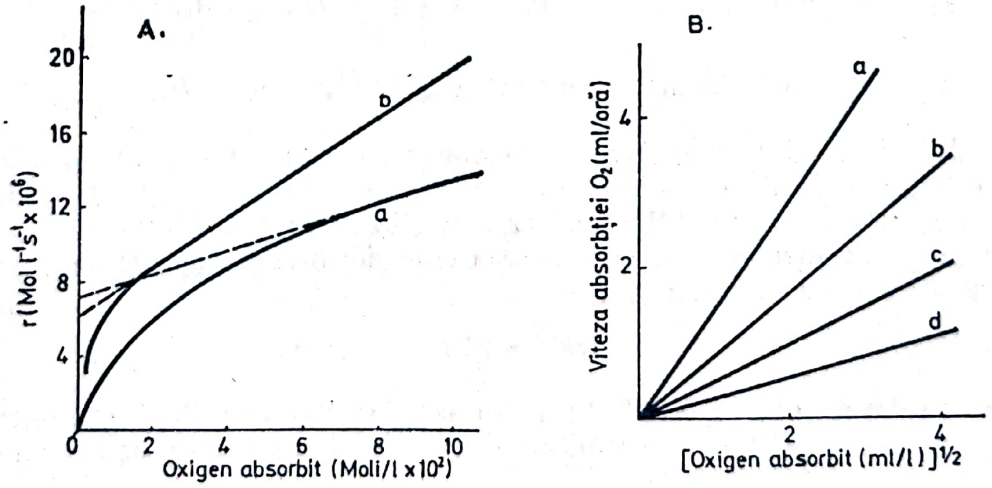


Fig. 2. 4. A. Influenţa presiunii O_2 asupra autooxidării.
A. Deviaţia de la liniaritate a curbelor de absorbţie a O_2 în timpul perioadei iniţiale de oxidare. a = tetralină 75°C/180 mm O_2, b = metilciclohexenă 66°C/350 mm O_2 ; după (7)
B. Relaţie între viteza oxidării difenilmetanului la 115°C şi gradul oxidării în timpul perioadei de propagare. a=760 mm O_2, b=105°C/760 mm O_2, c =67mm O_2, d = 760 mm + 50% clorbenzen (7)

unei mici cantităţi de tetralină la cumen reduce randamentul autooxidării, deşi tetralina se oxidează mult mai uşor. Romero şi Morton [37] au arătat că fracţiunile molare ale diferitor lipide dintr-un amestec influenţează invers proporţional viteza autooxidării. După ei variaţia oxidării unui amestec m format din doi componenţi este dată de:

$$d_m = \frac{W_0 + W_1}{W_0/d_0 + W_1/d_1} \tag{15}$$

în care 0 şi 1 sînt cei doi componenţi, d = densitatea şi W = greutatea moleculară. În timpul descompunerii monomoleculare a hidroperoxizilor, viteza de reacţie scade cu fracţiunea molară a componenţilor [39].

Cu toată complexitatea procesului de peroxidare şi a tratării cinetice formulele prescurtate explică satisfăcător evoluţia autooxidării, cu corecţiile datorită naturii substraturilor. Recent se încearcă o revizuire a cineticii, folosind metode mai perfecţionate (rezonanţă, puls radioliză [32, 33] sau influenţa activării controlate a O_2 [1, 20, 34].

2.3. STUDII TERMOCHIMICE

Pentru a putea preveni peroxidarea sau pentru a cunoaşte poziţiile din structura unei substanţe mai expuse iniţierii autooxidării s-au studiat termochimic un număr mare de compuşi. De asemenea s-au efectuat studii termochimice asupra descompunerii unor peroxizi în vederea cunoaşterii posibilităţilor de a influenţa terminarea peroxidării.

În procesul peroxidării, energia disocierii legăturilor este importantă pentru propagarea în lanţ a peroxidării conform reacţiei (4). Se ştie că energia disocierii unei legături $D_{(A-B)}$ este definită prin căldura de formare Q_f a moleculei. Deci $A - B \rightarrow A + B - D_{(A-B)}$, de unde

$$D_{(A-B)} = Q_{f(A)} + Q_{f(B)} - Q_{f(A-B)} = D_0 - R_A - R_B \tag{16}$$

în care R_A şi R_B sînt energiile de rezonanţă stabilizatoare ale moleculei iar D_0 este energia de disociere. Pentru radicalii benzil şi alil D_0 este de aproximativ 25 kcal. Stabilizarea radicalului benzil depinde de energia de delocalizare a electronilor π. Variaţia energiei de activare E este legată de energia de disociere prin relaţia

$$\Delta E = \alpha \Delta D, \tag{17}$$

în care α este de obicei 0,3 [14]. S-au tabelat valorile E şi D pentru o gamă largă de legături. Menţionăm după Uri [47] următoarele valori:

$D_{H-O_2} = 35$ kcal, $D_{H-OH} = 102$ kcal, $D_{H-H} = -104$ kcal, $D_{O-O} = 118$ kcal.

Reacţia (4) a fost studiată termodinamic calculîndu-se căldura de reacţie

$$H = R_{ROO\cdot} - D_{(OO-H)} + D_{(C-H)}(-R_{conj}), \tag{18}$$

Scanned with OKEN Scanner

în care $R_{ROO\cdot}$ este energia de rezonanţă a radicalului alchilperoxi cu o valoare de 15 kcal/mol [11], R_{conj} este energia de rezonanţă pierdută prin deconjugare iar $R_{R\cdot}$ energia de rezonanţă a radicalului alchil produs. Studiile termochimice au permis aprecierea reactivităţii unor substanţe. Astfel Scott [41] a găsit că reactivitatea metilpentanului variază după poziţia atomilor de carbon primar, secundar şi terţiar în proporţia 1 : 4 : 23, reactivitatea carbonului secundar scade spre centrul catenei.

Tabelul 2.1.

Relaţia între oxidarea olefinelor şi valorile energiilor de rezonanţă

Olefina	E (kcal)	$R_{R\cdot}$ (kcal)
$CH_2=CH-\overset{x}{C}H_3$	13,5	0
$CH_2=CH-\overset{x}{C}H_2-R$	11,5	5
$R_2C=CH-\overset{x}{C}H_2-CH_3$	9	11
$RCH=CH-\overset{x}{C}H_2-CH=CHR$	6	19
$CH_2=CH-\overset{x}{C}H_2-$	10	9

x indică atomul de carbon de unde se pierde un H. După Scott [41].

Uşurinţa cu care olefinele suferă autooxidare chiar la temperaturi obişnuite se datoreşte marii selectivităţi a radicalului alchilperoxi produs prin pierdere de H şi scăderea energiei de activare E_3 (din trei tipuri ale atomului de carbon, primar, secundar şi terţiar). După Bolland [13] echivalentul relaţiei (14) devine:

$$E_3 = E_c - {}^1/_2E_i + {}^1/_2E_6, \qquad (19)$$

în care E_c este energia de activare a autooxidării catalizată prin benzoil peroxid, E_i — energia de activare a descompunerii peroxizilor = 30 kcal/mol şi E_6 — energia de activare a reacţiei dintre doi radicali alchilperoxi şi poate fi neglijată. E_3 este legată de energia de rezonanţă $R_{R\cdot}$ prin relaţia

$$E_3 = 0{,}4\ R_{R\cdot}. \qquad (20)$$

Prin relaţia (20) utilitatea unor tabele ca 2.1 devine evidentă.

Aprecierea teoretică pe cale termochimică a relaţiilor dintre radicalii peroxizi şi structura hidrocarburilor a fost subiectul a numeroase studii [15, 24, 44], dar care nu au oferit posibilitatea unor reguli clare. Prezentăm în tabelul 2.2 reactivitatea unor hidrocarburi înrudite structural şi influenţa parţială doar a poziţiei atomilor de carbon:

Încercarea de generalizare a lui Bolland [13] a legăturii dintre energiile de rezonanţă ale radicalilor cu energia de activare au fost confirmate [10] doar pentru hidrocarburi relativ nepolare. Cu toate că gru-

Scanned with OKEN Scanner

pările ciano şi ceto au efecte stabilizatoare de rezonanţă, cetonele şi nitrilii se autooxidează dificil (tabelul 2.2). Pe de altă parte eterii se autooxidează uşor cu un mare randament în peroxizi, efectul activator al unui α-oxigen este mai mare de 20 ori decît al unei grupări α-metil.

Tabelul 2.2

Reactivitatea relativă (k_3) a unor hidrocarburi aromatice (metil benzen substituite) faţă de ROO· la 90° C [41]

Terţiar		Secundar		Primar	
p-Di-izopropilbenzen	2,7	Dibenzileter	21	Mesitilen	0,26
p-*terţ*-Butilcumen	2,3	Tetralină	9,4	*p*-Xilen	0,23
p-Cimen	2,3	Indan	5,4	*m*-Xilen	0,15
Cumen	1,9	Alilbenzen	5,0	Toluen	0,15
p-Bromocumen	1,5	Difenilmetan	2,1	*p*-Clorotoluen	0,12
Metil-*p*-cumat	1,06	Etilbenzen	1,1	*p*-Tolunitril	0,05
p-Nitrocumen	1,0	Benzilclorură	0,28	*p*-Nitrotoluen	0,05
Fenildimetilsilan	0,04	Fenilacetonitril	0,11		

2.4. EFECTUL AGENŢILOR FIZICO-CHIMICI

După cum am menţionat anterior peroxidarea nu poate avea loc decît în prezenţa unor condiţii de mediu adecvate, prezenţa oxigenului este indispensabilă, urmînd apoi lumina, temperatura, umiditatea etc. Deoarece influenţa luminii necesită un mecanism aparte, iar aplicaţiile au particularităţi deosebite această parte va fi tratată separat (Capitolul 4).

2.4.1. EFECTUL PRESIUNII PARŢIALE DE OXIGEN ASUPRA PEROXIDĂRII

Ecuaţia (14) indică viteza de autooxidare a hidrocarburilor la presiuni înalte de O_2 şi în condiţii în care reacţia (7) este singură în etapa de terminare a peroxidării. La presiuni joase de O_2 s-a propus relaţia:

$$-\frac{d[O_2]}{dt} = k_2[R\cdot][O_2] = k_2 k_4^{-1/2} r_i^{1/2}[O_2]. \qquad (21)$$

Pentru presiuni intermediare, în care trebuie să se ţină seama de toate trei reacţiile de terminare (5, 6, 7), s-au propus relaţii complicate [41] care însă sînt mult influenţate de structură. Astfel în fig. 2.5. A este prezentată contribuţia reacţiilor de terminare (5, 6, 7) pentru etillinoleat în absenţa unui antioxidant. Se pare că cu cît hidrocarbura este mai oxidabilă cu atît terminarea prin ramificare predomină. În fig. 2.5. B se arată că presiunea la care viteza autooxidării devine independentă de presiunea O_2, creşte marcat de la hexadecen care dă un radical simplu alilic la 2,6-dimetilhepta-2,5-dien ce produce un radical de înaltă rezonanţă. Hidrocarburile care produc radicali de rezonanţă alchil prin pierdere de H vor avea reacţii de terminare ramificate din cauza scăderii vitezei reacţiei dintre O_2 şi radicalii peroxi [25].

Scanned with OKEN Scanner

Relaţia dintre formarea epoxizilor şi presiunea O_2 în timpul autooxidării stirenului a fost studiată în detaliu de Mayo [27]. La presiuni mai mari de 20 mm, viteza autooxidării este aproape independentă de presiunea O_2 (fig. 2.5. B) şi predomină reacţia (7) de terminare, dar cu cît presiunea scade, terminarea cu ramificare devine mai importantă şi viteza de polimerizare scade. În absenţa completă a O_2, polimerizarea va fi rapidă

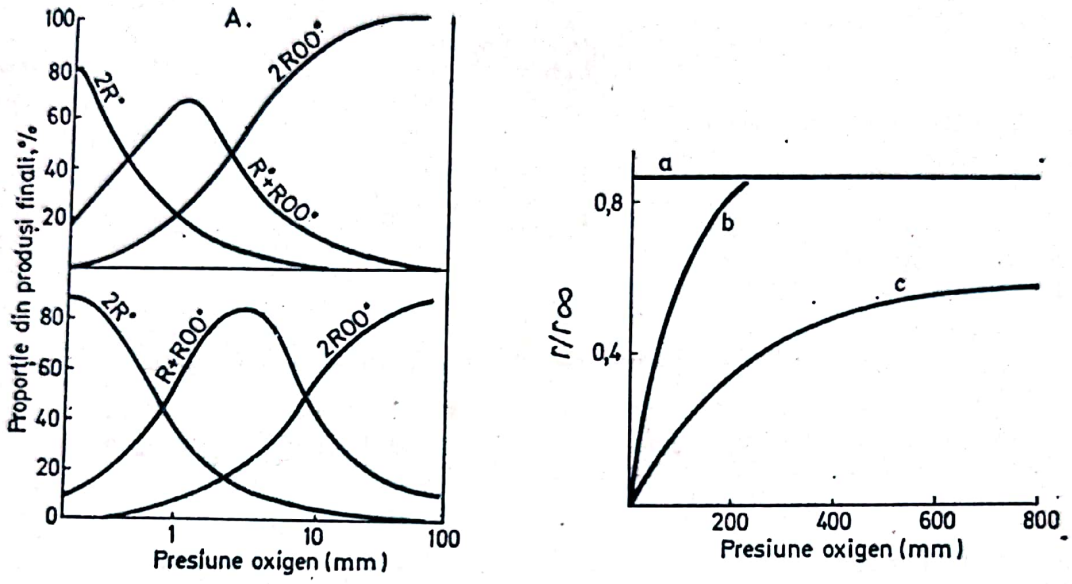


Fig. 2.5. A. Perioada de terminare pentru a = etillinoleat, b = fiten la diferite presiuni de oxigen şi la 45°C B. Efectul presiunii O_2 asupra vitezelor de oxidare ale hidrocarburilor nesaturate. a = hexadecen, 45°C, b = etilionoleat, 45°C, c=2,6-dimetil-hepta-2,5-dien, 25°C, după [8]

predominînd polimerizarea în lanţ vinilic conform reacţiei (5). Spre deosebire de stiren, viteza de oxidare a metilstirenului este dependentă de presiunea O_2 chiar la presiunea atmosferică la 50°C. Reacţia (6), de terminare predomină la presiuni O_2 de la 25 mm Hg în comparaţie cu presiuni =1 mmHg pentru stiren. Acest fapt produce o stabilizare a radicalilor de tip R· şi o viteză maximă în formarea epoxizilor la presiuni mai mari (fig. 2.4. D). În acest caz formarea epoxizilor este asociată şi cu o degradare mai mare a radicalilor peroxialchil la compuşi carbonil [7].

Copolimerizarea olefinelor poate fi controlată prin variaţia raportului O_2 : monomer. La presiuni mari de O_2, în raport 1 : 1 cu monomerul, se obţin copolimeri (fig. 2.6. A, b), pe cînd la presiuni mici s-a observat o homopolimerizare obişnuită (fig. 2.6. A, a). Mecanismul propus [27] presupune adiţia la dubla legătură şi formarea radicalilor peroxi.

Izomerii conjugaţi ai acidului linoleic nu produc hidroperoxizi decît după absorbţia unui mol de O_2 [30]. Absorbţia O_2 a fost asociată cu reducerea conjugării şi cu formarea unor peroxizi polimerici (fig. 2.6. B). Reacţia a este o adiţie a O_2 la carbonii 1,4 ai dienei conjugate, dar ambele căi duc la formarea unor peroxizi ciclici sau endoperoxizi (fig. 2.6. C). Endoperoxizi de acest tip au fost observaţi în copolimerizarea ciclohexadienului [12], oxidarea 1,2-dihidronaftalenei [23], a unor steroizi şi hidrocarburi policiclice [2, 9], dar în prezenţa unui fotoactivator ca albastru

Scanned with OKEN Scanner

de metilen capabil de a activa O_2 sau sistemul de legături dien

2.4.2. EFECTUL TEMPERATURII

Starea staţionară a concentraţiei hidroperoxidului $(ROOH)_{max}$ depinde numai de temperatură şi concentraţia hidrocarburii. Aceasta se observă şi din relaţia (13), care leagă R de întreg procesul de peroxidare,

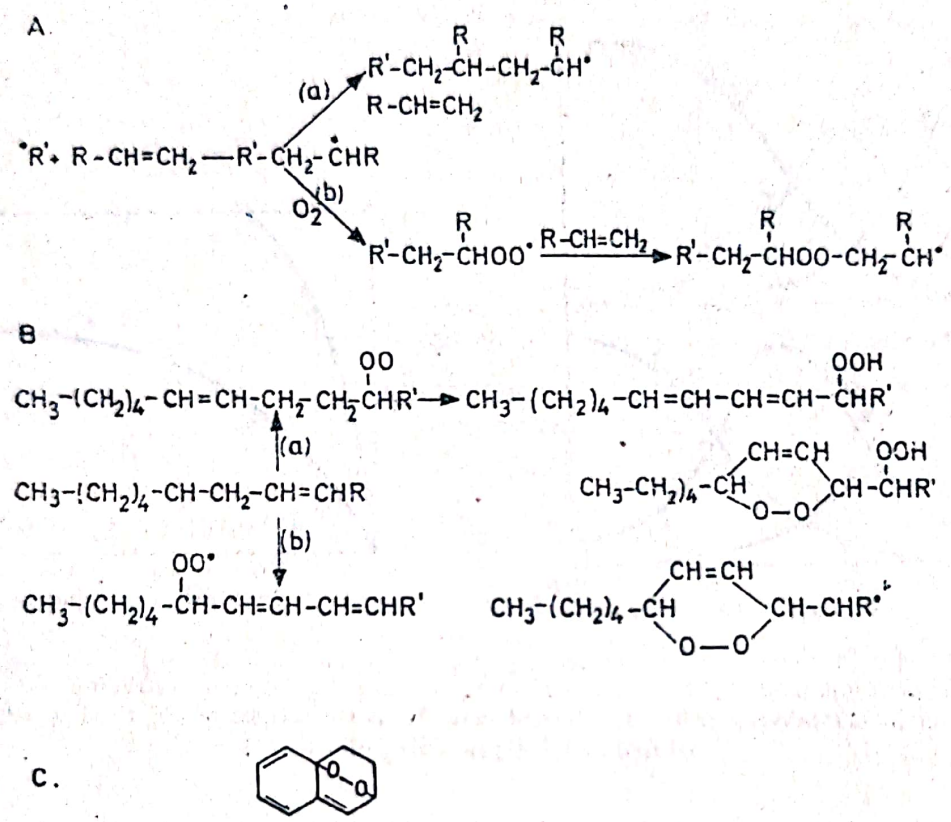


Fig. 2.6. Exemple de autooxidare prin adiţie la dubla legătură. A. Copolimerizarea unei olefine ; B. Linoleat şi formarea intermediară de peroxizi ciclici ; C. Endoperoxid format prin autooxidarea 1,2-dihidronaftalen, după Scott [41].

dar şi de relaţia (19) care indică cantitativ influenţa temperaturii. De exemplu, în cazul linoleatului de etil E_3 este negativă [11] şi starea staţionară a hidroperoxizilor va scade rapid odată cu creşterea temperaturii. Hidrocarburi mai greu oxidabile, care au o energie de activare mai mare pentru reacţia de pierdere a unui H (reacţia 1), au o dependenţă mai mică faţă de temperatură şi în general randamentul în peroxizi este mai mic la hidrocarburi alchilice decît la cele olefinice [26].

În general, cu cît este mai scăzută concentraţia $(ROOH)_{max}$ cu atît mai rapid este atinsă starea staţionară. Din punct de vedere aplicativ, s-a găsit că în aceste condiţii sînt ineficienţi agenţii care interferă cu reacţiile de producere a radicalilor liberi. Efectul antioxidanţilor depinde de $(ROOH)_{max}$ şi vor fi mai ineficienţi la temperaturi mari. În condiţii de producere a $(ROOH)_{max}$, produsele finale depind de reacţiile de descompunere a hidroperoxizilor sau de reacţii alternative la formarea peroxizilor. Un exemplu al influenţei temperaturii asupra oxidării unei substanţe ni-l oferă

Scanned with OKEN Scanner

propanul, care la 25°C va produce izopropil hidroperoxid, datorită legăturii 2—C—H de 5 kcal. La 100°C se va obține

$$H_3C-CH_2-CH_3 \xrightarrow{2\,O_2} H_3C-CHOO\cdot -CH_3 \rightarrow H_3C-CHOOH-CH_3 \rightarrow$$
$$\rightarrow H_3C-CHO-CH_3$$

un amestec de hidroperoxizi și aldehide, iar peste 300°C nu mai pot fi detectați hidroperoxizi [19]. În regiunea 400°C, viteza oxidării scade cu creșterea temperaturii, apărînd propilenă și H_2O_2. Mecanismul întregului proces nu a fost elucidat satisfăcător [31].

Energiile de disociere a legăturii, D(RO—OR), pentru majoritatea peroxizilor organici sînt cuprinse între 20—40 kcal/mol, deoarece reacțiile inverse au energii de activare neglijabile. Determinarea vitezelor și energiilor de activare sînt complicate de producerea unor descompuneri a peroxizilor de către radicalii inițiali produși. Diferențele în viteza scindării termice între diferiți peroxizi sînt determinate în primul rînd de stabilizarea rezonanței radicalilor RO·. Astfel perioadele de semiviață la 100°C a di-*t*-butil peroxidului, *t*-butil perbenzoatului și benzoil peroxidului sînt respectiv de 200, 20 și 0,6 ore, reflectînd o mai mare stabilizare de rezonanță a radicalului benzoilperoxi [4]. Astfel de variații sugerează că în cazul peroxizilor mai instabili descompunerea implică homoliza simultană a două sau mai multor legături, ca pentru

$$C_4H_9O- \quad -O- \quad -CO- \quad -CO- \quad -O- \quad -OC_4H_9$$

di-*t*-butilperoxilat cu o semiviață de 6,8 minute la 60°C. Pe de altă parte, descompunerea α-metilstiren poliperoxidului nu presupune o variație a energiei libere [28], deoarece produsele reacției sînt aceleași pentru o gamă largă de temperatură. Cu toate acestea, scindarea legăturilor O—O și C—C în acest caz nu este simultană deoarece agenți de transfer ai hidrogenului (hidrochinona) sau agenți antioxidanți inhibă descompunerea prin stabilizarea radicalilor. Gradul scindării legăturii C—C este o funcție nu numai de tăria acestei legături, dar și de temperatura reacției și capacitatea de donare de H a solventului. Raley [36] a găsit o valoare a variației energiei de activare de — 11 kcal pentru radicalul *tert*-butoxil într-un solvent mai puțin oxidabil, *tert*-butil-benzen. Oricum, solventul nu poate afecta energia de activare a unei reacții de eliminare (de exemplu 5), variația energiei de activare va fi datorată unei reacții de transfer de hidrogen (4). În schimb pentru solvenți mai oxidabili (dioctil eter) reacția de eliminare este mai sensibilă la temperatură. Sciziunea legăturii C—C devine importantă la temperaturi înalte, deși în aceste cazuri crește și oxidabilitatea solventului [29].

Oricum, influența temperaturii constituie un factor foarte important în controlarea peroxidării substanțelor organice, depășind uneori efectul antioxidanților sau al deactivatorilor, mai ales la temperaturi înalte, în care se atinge rapid o concentrație maximă de peroxizi [46]. La temperaturi mari sînt eficienți doar antioxidanții ce conțin sulf (dimetilsulfoxid), deoarece acționează asupra perioadei de inițiere și nu asupra celei de propagare (Capitolul 5).

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

1. S. ABRAMOVITCH, J. RABANI, *J. Phys. Chem.*, **80**, 1562 (1976).
2. R. R. ALLEN, A. JACKSON, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **26**, 395 (1949).
3. A. BACH, *Compt. rendu*, **124**, 951 (1897).
4. P. D. BARTELETT, E. P. BENZING, R. E. PINCOCK, *J. Am. Chem. Soc.*, **82**, 1762 (1960).
5. L. BATEMAN, G. GEE, *Proc. Roy. Soc.* London, *Ser.* A, **195**, 391 (1948).
6. L. BATEMAN, G. GEE, *Trans. Faraday Soc.*, **47**, 155 (1951).
7. L. BATEMAN, H. HUGHES, A. MORRIS, *Discuss. Faraday Soc.*, **14**, 190 (1953).
8. L. BATEMAN, A. MORRIS, *Trans. Faraday Soc.*, **49**, 1026 (1953).
9. W. BERGMANN, M. J. MC LEAN, *Chem. Rev.*, **28**, 367 (1941).
10. M. S. BLOIS, H. W. BROWN, R. M. LEMMON, „Free Radicals in Biological Systems" Academic Press, New York, 1961.
11. J. L. BOLLAND, G. GEE, *Trans. Faraday Soc.*, **42**, 236 (1946).
12. J. L. BOLLAND, *Quart. Rev.*, **3**, 1 (1949).
13. J. L. BOLLAND, *Trans. Faraday Soc.*, **46**, 358 (1950).
14. E. T. BUTLER, M. POLANYI, *Trans. Faraday Soc.*, **39**, 19 (1943).
15. A. G. DAVIES, „Organic Peroxides", Butterworth, London, 1961.
16. E. H. FARMER, A. SUNDDRALINGAM, *J. Chem. Soc.*, **125** (1943).
17. E. H. FARMER, D. A. SUTTON, *J. Chem. Soc.*, **10** (1946).
18. R. N. FEINSTEIN, „Implications of Organic Peroxides in Radiobiology" Rad. Res., Suppl. 3, 1963.
19. N. V. FOK, A. B. NALBANDYAN, *Dokl. Nauk Akad. CCCP* **89**, 125 (1953).
20. A. A. FRIMER, I. ROSENTHAL, *Tetrahedron Lett.*, **5**, 331 (1976).
21. D. K. GRANT, C. F. TIPPER, *J. Chem. Soc.*, **640** (1955).
22. H. HOCK, F. DEPKE, *Ber.*, **83**, 317 (1950).
23. H. HOCK, F. DEPKE, *Ber.*, **84**, 122, 349 (1951).
24. R. T. HOLLMAN, O. ELMER, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **24**, 127 (1954).
25. R. A. JOHNSON, *Tetrahedron Lett.*, **5**, 331 (1976).
26. W. O. LUNDBERG, J. R. CHIPAULT, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **26**, 109 (1949).
27. R. F. MAYO, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2465 (1958).
28. F. R. MAYO, A. A. MILLER, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2480 (1958).
29. R. A. MAX, F. F. DEATHRAGE, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **28**, 110 (1951).
30. N. A. MILLAS, L. H. PERCY, *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 1938 (1946).
31. N. A. MILLAS, A. A. MILLER, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2500 (1958).
32. E. T. NIKI, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2**, 1770 (1977).
33. J. OKATSU, T. TEYI, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **51**, 188 (1978).
34. J. OGATA, J. SAWAKI, *J. Org. Chem.*, **41**, 373 (1976).
35. S. PREVETT, W. O. LUNDBERG, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **30**, 17 (1953).
36. J. F. RALEY, F. F. RUST, *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 1336 (1948).
37. A. J. ROMERO, I. D. MORTON, *J. Sci. Food Agric.*, **26**, 1353 (1975).
38. G. A. RUSSELL, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 1047 (1953).
39. G. A. RUSSELL, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4583 (1955).
40. T. SASSURE, *Ann. Chim. Phys.*, **2**, 337 (1820).
41. G. SCOTT, „Atmospheric Oxidation and Antioxidants", Elsevier, London, 1965.
42. H. H. SEPHTON, D. A. SUTTON, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **23**, 363 (1953).
43. H. L. STEPHENS, *J. Am. Chem. Soc.*, **50**, 568 (1928).
44. M. SZWARC, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5696 (1958).

Scanned with OKEN Scanner

45. A. V. TOBOLSKY, D. J. METZ, R. B. MESROBIAN, *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 1942 (1950).
46. A. V. TOBOLSKY, R. B. MESROBIAN, „Organic Peroxides", Interscience, New York, 1954.
47. N. URI, *Chem. Revs.*, **50**, 3751 (1952).
48. C. WALLING, „Free Radicals in Solution", Wiley, New York, Chap. 9, 1957.
49. C. WALLING, *Rad. Res.*, Suppl. **3**, 3 (1965).
50. D. H. WHEELER in „Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids" eds. R.T. Hollman, W. O. Lundberg, Pergamon, London, Chap. 6, 1954.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 3

PEROXIZI

3.1. SUBSTRATURI

O gamă foarte largă de substanţe organice se autooxidează pînă la diferite stadii; din acestea, peroxidarea a fost studiată mai ales la olefine, acizi graşi, carotenoide, terpene, aldehide, oxiacizi, hidroximetil cetone, eteri, endioli, fenoli, catecolamine, medicamente, polimeri etc.

HIDROCARBURILE saturate produc peroxizi doar prin metode specifice chimiei organice [59] şi cu randament mic. Astfel, oxidarea metilpentanului la 130° produce 1-metilciclopentilhidroperoxid cu un randament de 8% [18]. Totuşi, în unele cazuri s-au obţinut randamente mai mari, cum ar fi *tert*-butil hidroperoxidul preparat din izobutan la temperaturi mari şi folosind HBr drept catalizator [45]. În schimb peroxidarea olefinelor, aril alcanilor se produce destul de uşor, iar hidroperoxizii rezultaţi sînt suficient de stabili pentru a fi izolaţi. Autooxidarea olefinelor constituie unul din cele mai vechi exemple de peroxidare şi se însoţeşte de o formare de polimeri [39], decurgînd conform mecanismelor expuse în capitolul 2. Astfel, se deosebeşte o perioadă latentă ce poate fi scurtată prin prezenţa unui peroxid sau a unei iluminări (vizibil sau ultraviolet), după care procesul continuă autocatalitic, terminîndu-se imprevizibil prin combinarea unor radicali sau controlat prin adăugarea unor antioxidanţi.

În perioada de iniţiere (inducţie) apare primul tip de radicali liberi, produşi mai ales prin descompunerea termică a unui peroxid pre-existent cum ar fi peroxidul de benzoil, conform reacţiei (1):

$$\begin{gathered} C_6H_5\dot{C}O-O-O-OCC_6H_5 \rightarrow 2\ C_6H_5CO-O\cdot \\ C_6H_5CO-O\cdot \rightarrow C_6\dot{H}_5 + CO_2 \end{gathered} \qquad (1)$$

Aceşti radicali liberi de forma generală R· şi ROO· atacă hidrocarburile în anumite puncte critice cum ar fi „poziţia alilică", adică gruparea $-CH_2-$ adiacentă unei duble legături sau nucleului aromatic. Atacul radicalului liber se caracterizează prin extragerea unui atom de H (2)

$$\begin{gathered} R-CH_2-CH=CH-R + C_6H_5CO-O\cdot \rightarrow R-\dot{C}H-CH= \\ = CH-R + C_6H_5COOH \end{gathered} \qquad (2)$$

În acest fel se produc radicali liberi ai hidrocarburii respective, care vor reacţiona cu oxigenul producînd peroxizi şi hidroperoxizi

$$R-\dot{C}H-CH=CH-R + O-O \rightarrow R-\underset{\displaystyle OOH}{\underset{|}{C}}H-CH=CH-R \qquad (3)$$

Scanned with OKEN Scanner

Hidroperoxidul se va descompune reluînd ciclul reacţiilor 1—3, conform mecanismelor expuse în capitolul 2. Formarea uşoară a peroxizilor din olefine şi hidrocarburi aromatice se datoreşte stabilităţii radicalilor alilici şi benzilici intermediari. În cazul cicloalcanilor sînt necesare temperaturi în regiunea 130—150°, pentru ca procesul să continue, în schimb pentru arilalcani, cum ar fi cumene sau tetralină, temperaturi de 70° sînt suficiente [2]. Electronul impar din radicalul nou format (reacţia 2) este delocalizat, fiind inegal distribuit între carbonii vecini. Acest fapt duce la două consecinţe: prima, după care se poate forma mai mult hidroperoxid, în funcţie de densităţile electronice ale atomilor de carbon vecini. A doua, după care viteza de formare şi randamentul în peroxizi este mai mare cu cît delocalizarea electronului impar este mai mare.

Tabelul 3.1

Randamentul în hidroperoxizi al unor olefine [53]

Olefina	Randament %	Temperatură °C	Viteza relativă de oxidare
$(CH_3)_2C{=}CHCH_2CH{=}C(CH_3)_2$	100	45	1210
$(CH_3)_2CHCH{=}CHCH_2CH(CH_3)_2$	99	60	
$\Phi CH_2CH{=}C(CH_3)_2$	98	55	
$CH_3(CH_2)_4CH{=}CHCH_2CH{=}CH(CH_2)_7COOEt$	99	55	193
$\Phi CH_2CH{=}CHCH_3$	95	65	
$((CH_3)_2C{=}CHCH_2CH_2C(CH_3){=}CHCH_2)_2$	93	55	34
$((CH_2)_2C{=}CH(CH_2CH_2C(CH_3){=}CH)_2CH_2)_2$	92	55	28
$CH_3(CH_2)_2CH{=}CHCH_2CH_3$	85	60	
$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOMe$	81	75	15
$CH_3CH(CH_3)CH_2CH_2CH{=}C(CH_3)_2$	80	35	
$(CH_3)_2CH(CH_2)_3CH(CH_3)CH{=}CH_2$	74	75	
$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH_2$	70	75	2,5

Tabelul 3.1. arată efectul protector al grupărilor vinil şi fenil asupra concentraţiei hidroperoxidului metilenic, datorat parţial protecţiei sterice a dublei legături de atacul radicalilor alchilperoxi. Farmer şi Sutton [17] au atras atenţia asupra migrării dublei legături în cursul peroxidării, ducînd la o izomerizare conjugată.

Din tabelul 3.2 se poate deduce că migrarea dublei legături în cursul peroxidării se datoreşte unei distribuţii electronice alternative, care prin atacul O_2 duce la formarea hidroperoxidului cu cea mai stabilizată rezonanţă; de exemplu efectul grupărilor fenil şi vinil în stabilizarea dublei legături metilenice. În general hidroperoxidul cel mai favorizat va fi cel cu gruparea OOH mai depărtată de grupările stabilizatoare. Uşurinţa formării alchil hidroperoxizilor este în ordinea terţiar > secundar > primar, ce poate fi însă schimbată cînd se produce o izomerizare conjugată (tabelul 3.2.).

Hidroperoxizii *alchilici* inferiori sînt lichide instabile, explozive, cel mai stabil fiind *tert*-butil hidroperoxidul. Hidroperoxizii formează săruri, relativ stabile, cu hidroxizii metalelor alcaline. Ca şi H_2O_2 hidroperoxizii sînt atît agenţi oxidanţi, cît şi reducători (dar mai slabi decît H_2O_2), fiind capabili să elibereze iodul din soluţii acidulate de KI, oxi-

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 3.2

Izomerizarea conjugată în timpul autooxidării olefinelor [5]

Olefine	Produse			
	Neconjugate	%	Conjugate	%
$\Phi CH_2CH=CH_2$	—	0	$\Phi CH=CHCH_2OOH$	100
$\Phi CH_2CH=CH(CH_3)_2$	—	0	CH_3 | $\Phi CH=CHCOOH$ | CH_3	100
$(CH_3)_2C=CHCH_2CH=C(CH_3)_2$	—	0	CH_3 | $(CH_3)_2C=CHCH=CHCOOH$ | CH_3	100
CH_3 | $RCHCH=CH_2$	CH_3 | $RCCH=CH_2$ | OOH	20	CH_3 | $RC=CHCH_2OOH$	80
$RCH_2CH=CH_2$	$RCHCH=CH_2$ | OOH	50	$RCH=CHCH_2OOH$	50
$RCH_2CH=C(CH_3)_2$	CH_3 | $RCH=CHCOOH$ | CH_3	30	$RCHCH=C(CH_3)_2$ | OOH	70

dează hidrogenul sulfurat, reduc $KMnO_4K$ şi săruri de argint. Peroxizii, ROOR, sînt lichide mult mai stabile decît hidroperoxizii şi se comportă ca agenţi oxidanţi slabi. Consecinţele peroxidării hidrocarburilor vor fi prezentate în capitolul 6.

ACIZII GRAŞI NESATURAŢI constituie al doilea grup de substanţe peroxidabile, autooxidarea lor are consecinţe atît economice, dar, aşa cum va fi prezentat în a doua parte a cărţii, mai ales biologice.

Autooxidarea se produce mai ales la acizi graşi cu mai multe duble legături şi cu număr mare de atomi de carbon, cum sînt acizii linoleic (C_{18}, 2Δ), linolenic (C_{18}, 3Δ) şi arachidonic (C_{20}, 4Δ), răspîndiţi în natură, fiind componente ale lipidelor din membrane. Spre deosebire de olefine, autooxidarea acizilor graşi nesaturaţi decurge după un singur mecanism, după care un radical iniţial $R\cdot$ produce extragerea unui atom de hidrogen din poziţia alilică (gruparea CH_2 dintre două duble legături) şi produce un nou radical liber conjugat $R\cdot$:

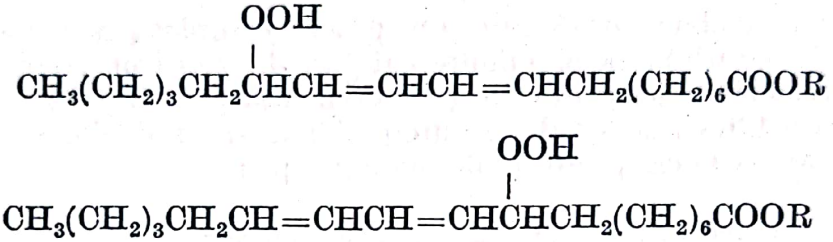
$$-CH=CH-CH_2-CH=CH- \;+ R\cdot \rightarrow$$

$$-CH=CH-\dot{C}H-CH=CH- \;+ RH \qquad (4)$$

Radicalul peroxidic $\overset{OO\cdot}{\overset{|}{-CH}}-CH=CH-CH=CH-$ reacţionează cu o nouă moleculă de acid gras producînd un nou radical peroxidic sau se transformă în hidroperoxizi de tipul ROOH. Aceşti din urmă hidroperoxizi

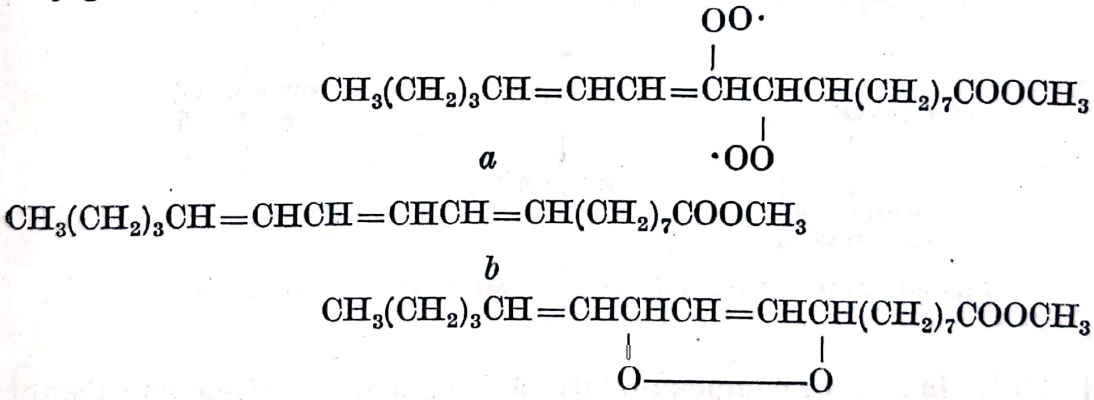
Scanned with OKEN Scanner

se descompun termic sau catalitic în alţi radicali liberi de tipul RO·, HO·, R·. Aşa cum s-a arătat în capitolul 2, procesul de autooxidare îşi generează astfel agenţii proprii de catalizare asigurînd dezvoltarea reacţiei în lanţ. O altă caracteristică a autooxidării acizilor graşi o constituie conjugarea dien observată la radicalii peroxidici şi care poate fi măsurată datorită maximului de absorbţie de la 230—234 nm [49]. Pentru aceeaşi moleculă de acid gras posibilităţile de izomerizare sînt destul de reduse. Astfel în cazul esterului acidului linoleic, din şapte izomeri teoretic posibili rezultaţi în urma peroxidării au fost izolaţi doar doi, ca urmare a reducerii la acizii hidroxistearici corespunzători [9]: $CH_3(CH_2)_3CH_2CH=CHCH_2CH=CHCH_2(CH_2)_6COOR$



(5)

Peste 90% din produşii finali ai autooxidării acizilor graşi nesaturaţi sînt hidroperoxizi conjugaţi. Pe măsură ce autooxidarea continuă, conjugarea descreşte [54] datorită transformărilor ce implică adiţie la sistemul dien conjugat. După cum s-a arătat în capitolul 2, consumul de oxigen creşte pe măsură ce autooxidarea decurge spre formare de peroxizi ciclici şi polimerizare. Ca şi în cazul olefinelor, s-au observat şi la acizii graşi nesaturaţi excepţii, aşa cum este metil eleostearatul, care conţine trei duble legături conjugate şi se autooxidează cu transformare concomitentă în dublă conjugare :

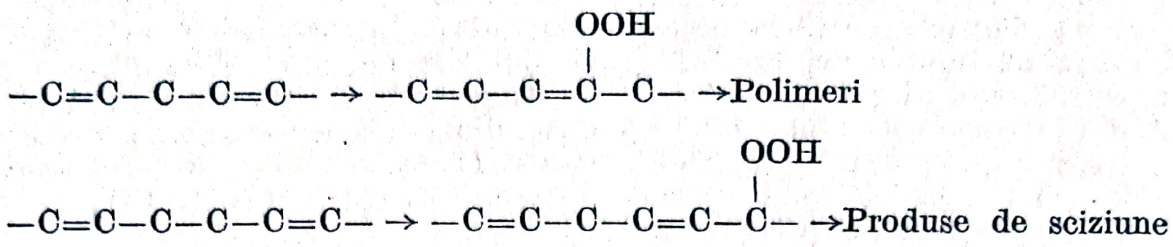


Treibs [60] a arătat că în absenţa solventului predomină calea (*a*) ducînd la polimerizare rapidă, pe cînd în prezenţa acetonei se vor forma peroxizi monomeri pe calea (*b*). Prin oxidare fotoactivată, Faulkner [16] a obţinut peroxizi ciclici monomeri ai metil eleostearatului, în proporţie de 54%, restul fiind polimerizat.

Atît la olefine, cît şi la acizi graşi se produc în urma peroxidării o serie largă de rearanjări ale dublelor legături. După Scott, sistemele dien conjugate au tendinţa de a trece în polimerizare chiar de la începutul peroxidării, pe cînd un singur sistem dien polimerizează doar în fazele

Scanned with OKEN Scanner

avansate ale autooxidării. Pe de altă parte, sisteme dien întrerupte de grupări dublu metilen produc hidroperoxizi a căror descompunere este asociată cu sciziuni ale legăturii C—C



Autooxidarea acizilor graşi este un proces complex, care începe cu o peroxidare dar continuă pe mai multe căi (fig. 3.1.) a căror pondere variază după natura acizilor sau prin condiţiile de mediu [14, 23]. La temperaturi ridicate (peste 120°C) se produce autooxidarea şi a lipidelor saturate [15] izolîndu-se peroxizi ca produse de oxidare primare.

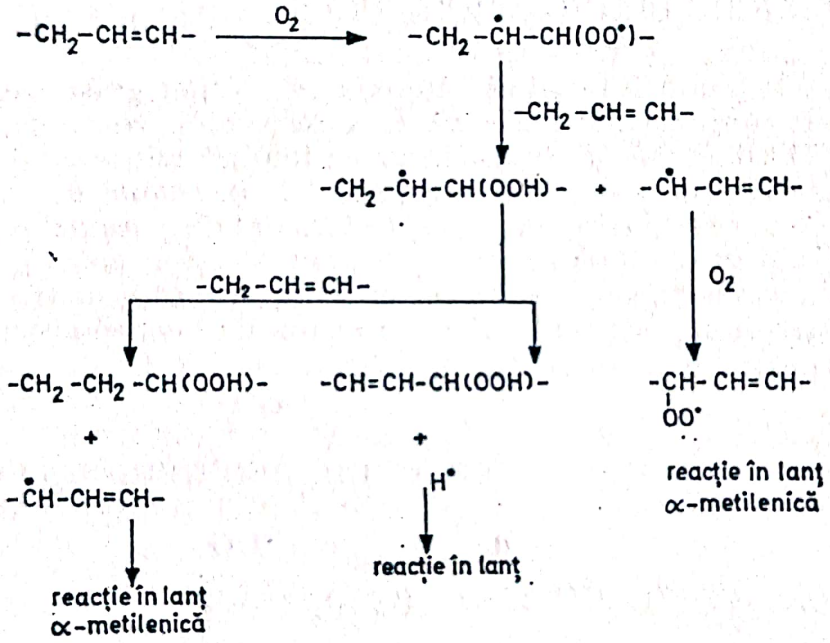


Fig. 3.1. Autooxidarea acizilor graşi nesaturaţi; prezentare schematică

LIPIDELE, în a căror compoziţie intră acizii graşi, constituie un substrat favorabil autooxidării şi deci a peroxidării. Componenta cea mai oxidabilă este acidul gras, care furnizează radicalii peroxi pentru autooxidarea şi altor componenţi. Grăsimile, care sînt un amestec complex de lipide şi conţin cantităţi însemnate de acizi graşi, sînt uşor oxidabile la temperaturi obişnuite, producînd „rîncezirea" (cap. 6), în care peroxidarea acizilor graşi se însoţeşte de descompunerea unor peroxizi, de oxidarea altor componenţi prezenţi, ceea ce produce în final un amestec complex de produşi volatili şi stabili (tabelul 3.3).

În afară de acizii graşi s-au mai izolat peroxizi rezultaţi din autooxidarea colesterolului [32] şi alcoxilipidelor (lipide ce conţin grupările alchil

Tabelul 3.3

Produși formați în cursul autooxidării grăsimilor

Produse gazoase	Aldehide volatile	Acizi volatili	Diacizi solubili	Produși oxidați monomeri	Produși oxidați polimeri	Peroxizi Hidroperoxizi
CO CO_2 H_2O	RCHO $CH_3(CH_2)_n$—CHO $CH_2-CH-CHO$ (O)	RCOOH $CH_3(CH_2)_n$—COOH	$(COOH)_2$ $(CH_2)_n-COOH$ COOH	Acizi mono- și dihidroxi stearici	Acizi dimeri și polimeri cu structuri încă necunoscute	$-CH(OOH)-CH-CH-$ Epidioxizi $-CH-CH$ (O—O)
	Hexenal Heptenal Octenal Decinal Undecinal Decadienal Volatili	neantrenabili și rezultați prin acidificare $n = 10-20$	Malonic Succinic Azelaic Sebacic	Epoxi Cetostearic Acizi stabili		
	Produși de sciziune			Produși oxidați		

sau alch-1-enil) [66]. Benzoil peroxidul reacţionează stoichiometric cu colesterol sau steroizi-5-en-3-ol dînd peroxizi cu o culoare albastră şi precipitabili cu acid tricloracetic [30]. Peroxidarea lipidelor constituie însă procesul de bază a autooxidărilor din fiinţele vii de care ne vom ocupa în partea a doua a cărţii.

ETERII constituie grupa a treia de substanţe autooxidabile. Eterul etilic conservat mult timp la lumină suferă o autooxidare conform schemei din

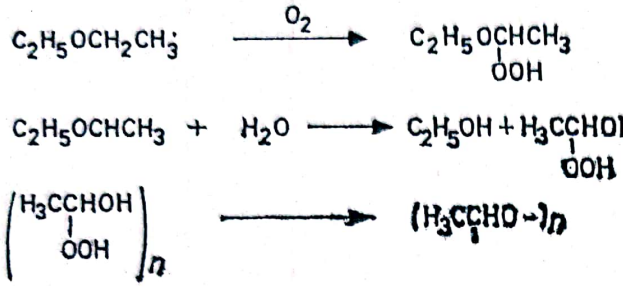


Fig. 3.2. Mecanismul autooxidării eterului etilic [59].

fig. 3.2. Peroxizii care se formează, monomeri sau polimeri, explodează uşor la manipulare neatentă. Eterul alcoolului izopropilic se autooxidează şi mai rapid, chiar la întuneric, fiind foarte exploziv.

În general substanţele labile conţin un atom de carbon metilenic legat de un metaloid printr-o legătură dublă sau triplă sau se găseşte sub influenţa unor substituenţi sau grupări electronegative. De exemplu atomii de hidrogen fixaţi la un atom de carbon în poziţia α faţă de dubla legătură (poziţia „alilică", aldehide, *o*-difenoli) sau efectul activator al atomului de oxigen în α, mai activ de douăzeci de ori decît gruparea α-metil, ori cel al atomului de sulf într-o sulfură alilică — similară în această privinţă cu o grupare vinil. În acest sens, tioeterii se autooxidează rapid [6]. Un fenomen remarcabil în autooxidarea tioeterilor este autoterminarea reacţiei (fig. 3.3.) datorită produşilor finali ce inhibă peroxidarea.

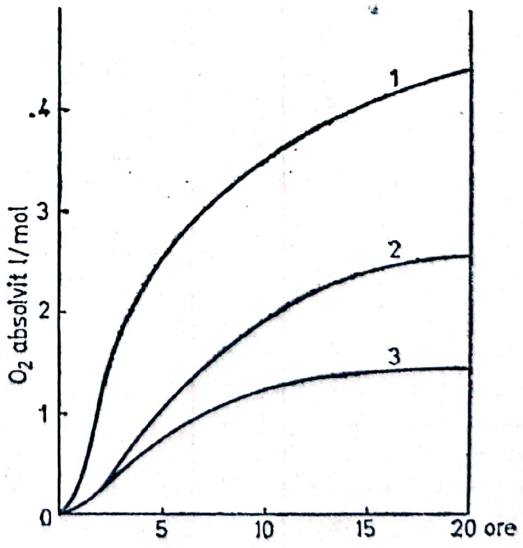


Fig. 3.3. Autooxidarea tioeterilor la 75°C;
(1) $C_6H_5CH = CHCH_2S$-*n*-C_4H_9,
(2) $CH_3CH = CHCH(CH_3)S$-*n*-C_4H_9,
(3) $CH_3CH = CHCH_2S$-*n*-C_4H_9 [6]

FOSFINELE (R_3P) au tendinţa să se autooxideze chiar la temperatura camerei, remarcîndu-se mai ales cele alifatice. Tendinţa de autooxidare a acestor compuşi este atît de mare încît sînt inflamabili spontan.

Scanned with OKEN Scanner

FENOLII se autooxidează prin pierderea unui electron şi apariţia unei game largi de radicali liberi de tipul prezentat în fig. 3.4.A. Prezenţa unor oxidanţi sau urme de ioni metalici accelerează procesul, care decurge pe mai multe direcţii, cum ar fi dimerizări, reacţii între radicali peroxi şi cei fenil, disproporţionări. În multe cazuri s-au putut izola [38] radicali peroxi de culoare albastră cu formula redată în fig. 3.4.B. Polifenolii sînt şi mai

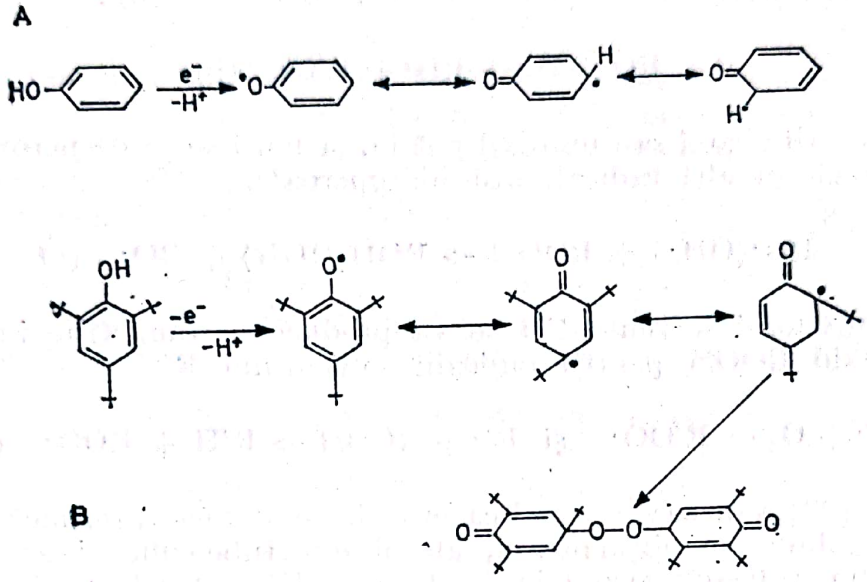


Fig. 3.4. A. Formarea unor radicali liberi din fenol; B. Producerea unor radicali liberi puternic colorați din fenoli substituiţi [33].

autooxidabili, mai ales cînd conţin gruparea OH în poziţiile 1,2 şi 1,4. Oxidabilitatea fenolilor şi aminelor aromatice creşte prin incorporarea unor substituenţi donori de electroni în poziţiile *o* şi *p*. Pe această proprietate se bazează folosirea pirogalolului la determinarea O_2 sau a activităţii peroxidazelor. Aminofenolii şi fenilendiaminele sînt autooxidabile mai ales în mediu alcoolic [62].

ALDEHIDELE, mai ales cele aromatice, sînt uşor autooxidabile datorită legării O_2 într-un peroxid ce se transformă rapid în acid perbenzoic. Formaldehida, acetaldehida şi cloralul formează cu H_2O_2 prin adiţie un hidroperoxid de forma $HOCH_2—O—O—OH$ sau $HOCH_2—O—O—CH_2OH$ cristalizabili. Au mai fost descrişi sau izolaţi peroxizi formaţi din terpene, cetone, acizi sulfinici [24, 29], hidroxilamină [29], peroxizi fluoruraţi [55].

3.2. DESCOMPUNEREA PEROXIZILOR

După cum s-a arătat în capitolul 2, în cursul peroxidării, mai ales în perioada de terminare se produc reacţii de descompunere care pot provoca întreruperea procesului. Descompunerea peroxizilor este importantă atît ca posibilitate de întrerupere a peroxidării, dar şi de iniţiere, deoarece după cum s-a arătat peroxizii îşi generează prin scindare propriul catalizator. În general se deosebesc trei tipuri de descompuneri generatoare de radicali liberi: termică, fotochimică şi prin transferul unui electron sau unei grupări reactive.

DESCOMPUNEREA TERMICĂ este la rîndul său un proces complicat. În primul rînd la temperaturi peste 150°C se produce o scindare a peroxidului

$$ROOH \rightarrow RO\cdot + OH\cdot \quad (a) \qquad (6)$$

după o cinetică de gradul întîi, care creşte apreciabil cu concentraţia peroxidului datorită suprapunerii cu o altă reacţie (b):

$$RO{-}OR' \rightarrow RO\cdot + R'O\cdot \quad (b)$$

Aceşti radicali alcoxi sau hidroxil pot iniţia noi reacţii de peroxidare sau reacţionează cu alţi radicali sau hidroperoxizi

$$RO\cdot(OH\cdot) + ROOH \rightarrow ROH(HOH) + RO\cdot \quad (c)$$

În prezenţa unui solvent R'H se va produce o competiţie între O_2 şi hidroperoxid ROOH pentru radicalii solventului R'·

$$R'\cdot + O_2 \rightarrow R'OO\cdot \quad \text{şi} \quad R'\cdot + ROOH \rightarrow R'H + ROO\cdot \quad (d)$$

Kharasch [28] a observat astfel că prin descompunerea termică a cumen hidroperoxidului se obţin metan, alcool dimetilbenzilic şi acetofenonă, derivaţi din radicalul alcoxi iniţial format. Efectul solventului poate fi urmărit în tabelul 3.4, în care se prezintă descompunerea termică a tetralin hidroperoxidului în prezenţa unei game largi de solvenţi. Thomas şi Harle [58] au observat o relaţie liniară între perioada de inducţie a autooxidării unor hidrocarburi şi viteza descompunerii tetralin hidroperoxizilor în acelaşi mediu; radicalii care iniţiază peroxidarea fiind produşi cu o viteză proporţională cu descompunerea lor. Efectul inductor al solvenţilor în descompunere mai reiese şi din faptul că solvenţii uşor oxidabili cresc viteza descompunerii peroxidului (tabelul 3.3). La concentraţii mari în hidroperoxid, ordinul întîi de reacţie este înlocuit cu ordinul doi în raport cu peroxidul ce se descompune. Stannett şi Mesrobian [56] au arătat că descompunerea 1,4-dimetilciclohexan hidroperoxidului este

Tabelul 3.4

Efectul solvenţilor asupra descompunerii tetralin hidroperoxidului la 170C° [58]

Solvent	$k \times 10^4 (s^{-1})$	E(act) (kcal/mol)
Izo-octan	1,31	—
n-Butil stearat	1,47	30,0
n-Tetradecan	2,32	—
Ulei alb	4,84	31,4
Hexadecen-1	7,92	28,0
Eter dioctilic	14,5	29,0
Polibuten	21,7	18,6
Polipropilenă	25,0	—

Scanned with OKEN Scanner

de ordinul întîi la concentraţii mai mici de 0,03 M cu $\Delta E = 32{,}8$ kcal/mol, iar la concentraţii peste 2 M prezintă o cinetică de ordinul doi cu $\Delta E = 28{,}6$ kcal/mol. După Bateman şi Hughes [4] descompunerea după ordinul doi se datoreşte unei stări asociate datorită unor punţi de hidrogen între doi peroxizi

$$RO\cdot + OH\cdot \rightarrow 2\,ROOH \rightarrow (ROOH\ldots\underset{\displaystyle H}{\underset{|}{O}}OR) \rightarrow ROO\cdot + H_2O + RO\cdot$$

Adăugarea unei mici cantităţi de solvenţi ce favorizează formarea unor punţi de hidrogen afectează profund ordinul de reacţie al descompunerii. Astfel, descompunerea ciclohexen hidroperoxidului 0,9 M este schimbată prin adăugarea acidului stearic de la ordinul doi la întîi.

În decursul descompunerii termice a peroxizilor se pot produce mai multe feluri de reacţii, care pot orienta desfăşurarea în continuare a autooxidării şi natura produşilor finali. Astfel se deosebesc:

A. Reducerea radicalului RO· de către solventul R'H sau altă moleculă de peroxid, ROOH, producînd un alcool ROH [8,23]:

$$RO\cdot + R'H \rightarrow ROH + R'\cdot \quad \text{sau}$$
$$RO\cdot + ROOH \rightarrow ROH + ROO\cdot \qquad (7)$$

B. Oxidarea de către un alt peroxid prezent în sistem producînd un compus carbonilic. Cînd X· este un radical alcoxi se produce o reacţie de disproporţionare dînd un amestec echimolecular de alcool şi aldehide [13].

$$R(R')CHO\cdot \xrightarrow{X\cdot} R(R')C=O + XH$$

C. Eliminarea unui fragment dintr-un radical pentru a da o moleculă stabilă şi producînd în special cetone [37]:

$$RR'R''C-O\cdot \rightarrow RR'C=O + \cdot R''$$

D. Asociere cu un alt radical liber identic RO· sau diferit R' [57]:

$$RO\cdot + RO\cdot \rightarrow ROOR' \quad \text{sau}$$
$$RO\cdot + \cdot R' \rightarrow ROR'$$

E. Adiţii la dubla legătură C=C [4]:

$$RO\cdot + \rangle C=C\langle \rightarrow RO-C-C\cdot$$

Ponderea diferitelor căi în descompunerea termică a unui peroxid este prezentată în tabelul 4.5, împreună cu legăturile scindate şi energia legăturii. Stabilitatea relativă a radicalilor scade de la 1 pentru primul membru ($CH_3O\cdot$) la 0,08 pentru ultimii doi radicali. Dealtfel instabilitatea radicalilor alcoxi este legată de stabilitatea produşilor finali.

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 3.5 5.

Reacțiile radicalilor alcoxi în ciclohexen la 195° C [1,53]

Radical alcoxi	% Reacție prin			Legătura scindată	*D* kcal/mol
	Reducere	Oxidare	Eliminare		
$CH_3O\cdot$	76	13	—	C—H	25
$CH_3CH_2O\cdot$	65	16	11	$C-CH_3$	13
$CH_3(CH_2)_3O\cdot$	30	26	29	$C-C_3H_7$	11
$CH_3C(CH_3)HO\cdot$	19	11	58	$C-CH_3$	10
$CH_3C(CH_3)HCH_2O\cdot$	6	25	67	$C-C_3H_7$	7
$CH_3C(CH_3)_2O\cdot$	8	—	92	$C-CH_3$	5

Pe lîngă descompunerea termică homolitică descrisă în cele de mai sus, în industrie se folosește o descompunere termică heterolitică cu acizi. Astfel într-o primă fază se produce un hidroperoxid din cumen sau izopropil benzen prin autooxidare la 100°, după care acesta se descompune prin încălzire cu acid sulfuric diluat formînd fenol și acetonă

$$C_6H_5C(CH_3)_2H \xrightarrow{O_2} C_6H_5C(CH_3)_2OOH \xrightarrow{H_2SO_4} C_6H_5OH + CH_3COCH_3$$

O serie de hidroperoxizi pot reacționa și prin reacții ce nu implică radicali liberi ci prin cataliză acidă sau alcalină cu rearanjări ionice. Kharasch [27] a observat că gruparea fenil migrează de preferință comparativ cu H sau gruparea alchil. Ordinea ușurinței de migrare a grupărilor fenil substituite în descompunerea ionică a metil hidroperoxizilor substituiți este *p*-OMe < *p*-Me < H < *p*-Cl < *p*-NO_2. În fig. 3.5 este prezentat un exemplu al descompunerii homolitice și ionice a aceluiași compus.

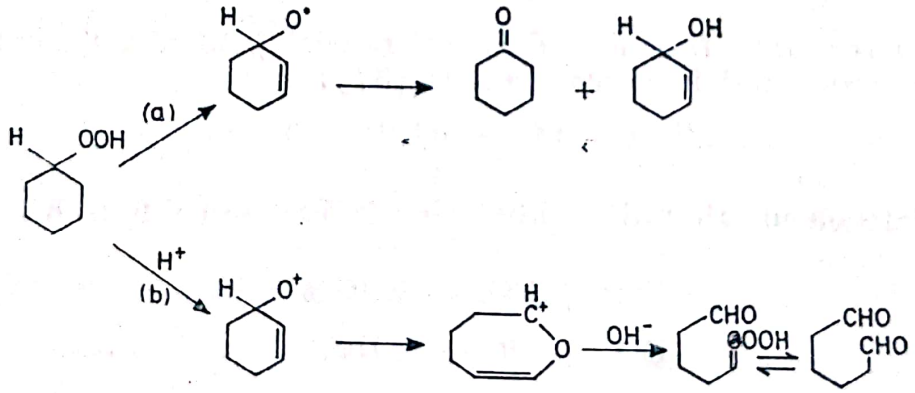


Fig. 3.5. Descompunerea homolitică și ionică a ciclohexan hidroperoxidului [26]

Descompunerea peroxizilor poate avea loc și în mediu alcalin, obținîndu-se în special alcoolii respectivi [26].

Descompunerea fotochimică va fi prezentată în capitolul 4.

DESCOMPUNEREA prin transferul unui electron presupune intervenția unui ion metalic aparținînd elementelor de tranziție (Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}) cu rolul de a micșora energia de activare a descompunerii. Reacția

Scanned with OKEN Scanner

generală poate fi reprezentată prin două ecuații asemănătoare celor din descompunerea termică (6 c), din care una va predomina :

$$\begin{gathered} ROOH + M^n \xrightarrow{(a)} RO\cdot + OH^- + M^{n+1} \quad (\text{sau } M^n - OH) \\ ROOH + M^{n+1} \xrightarrow{(b)} ROO\cdot + H^+ + M^n \end{gathered} \tag{8}$$

A. Cînd ionul metalic este un agent oxidant puternic, reacția 8a decurge foarte încet, încît sînt necesare concentrații stoichiometrice de ion metalic, producîndu-se 1 mol O_2 pentru fiecare moleculă de peroxid. Reacția dintre tetraacetatul de plumb și tetralin hidroperoxid a fost folosită ca metodă de dozare pentru hidroperoxizi [11] :

$$\begin{gathered} ROOH + Pb(OAC)_4 \xrightarrow{(a)} ROO\cdot + (Pb(OAc)_3) + AcOH \\ ROO + (Pb(OAc)_3) \xrightarrow{(b)} ROAc + O + Pb(OAc)_2 \end{gathered} \tag{9}$$

B. Cînd ionul metalic este un agent reducător puternic, reacția 8b este foarte înceată comparativ cu reacția 8a. Produsele principale ale reacției derivă din radicalul alcoxi, care poate fi captat prin adiție la dubla legătură. De exemplu cumen hidroperoxidul în exces reacționează cu butadiena în prezența ionului feros cu producerea unui radical alilic stabil care dimerizează ușor [28] :

$$2RO\cdot + 2CH_2 = CHCH = CH_2 \xrightarrow{Fe^{2+}} 2ROCH_2CH = CH - \dot{C}H_2 \rightarrow$$
$$ROCH_2CH=CH-CH_2CH_2CH=CHCH_2OR$$

C. Cînd ionul metalic are două stări de valență de stabilitate egală. Spre deosebire de cazurile precedente care nu produceau reacții în lanț, în prezența ionilor de cupru, cobalt, mangan în concentrații mici (sub 10^{-6}M) are loc o descompunere rapidă a hidroperoxizilor în radicali ce promovează autooxidarea ($RO\cdot$, $ROO\cdot$ și $OH\cdot$). Reacțiile în lanț care se propagă sînt de forma :

$$\begin{gathered} Co^{3+} + ROOH \xrightarrow{(a)} Co^{2+} + ROO\cdot + H^+ \\ Co^{2+} + ROOH \xrightarrow{(b)} Co^{3+} + RO\cdot + OH\cdot \\ 2ROO\cdot \xrightarrow{(c)} 2RO\cdot + O_2 \end{gathered} \tag{10}$$

În cazul *tert*-butil hidroperoxidului reacția 10a este de 300 ori mai rapidă decît 10b [12], producînd în final *tert*-butil alcool.

Hidroperoxizii se pot reduce producînd radicali liberi în urma acțiunii unor reducători ca amine, glucide, tioli, β-ceto enoli și alți compuși ce conțin atomi de hidrogen labili după mecanisme asemănătoare ionilor metalelor de tranziție. Reacțiile redox de acest tip au o mare importanță ca inițiatori pentru polimerizarea vinilului, polimerizare în emulsie [51] în scopuri industriale [3, 7, 44].

Scanned with OKEN Scanner

3.3. PROOXIDANȚI

Se cunosc două feluri de mecanisme care favorizează autooxidarea. A. Primul mecanism și cel mai important acționează prin micșorarea timpului necesar atingerii părții liniare a curbei de autooxidare (perioada de inițiere, latentă) și rezultă din prezența hidroperoxizilor care se descompun sau a unor agenți care catalizează această descompunere, cum ar fi ionii metalici, razele ultraviolete, căldura. Așa cum s-a arătat în secțiunea precedentă (3.2), ionii metalelor tranziționale activează descompunerea hidroperoxizilor prin scăderea energiei de activare. Noii radicali liberi produși măresc viteza de inițiere a lanțului reactiv, conform reacțiilor 3.8—10. Acest tip de activare este cel mai frecvent întîlnit și are implicații industriale atît în polimerizarea dirijată a olefinelor, dar și în îmbătrînirea accelerată a polimerilor (capitolul 6).

Woodward și Mesrobian [63] au arătat că autooxidarea tetralinei catalizată de acetatul de cobalt decurge conform ecuației 2.13, după care viteza maximă de oxidare este proporțională cu pătratul concentrației tetralinei și independent de concentrația ionului metalic. Aceasta sugerează că ionii metalici nu au efect asupra etapelor de propagare a autooxidării, confirmat și în fig. 3.6 A, după care creșterea concentrației Co^{2+} produce o scădere a perioadei de inițiere fără afectarea porțiunii liniare a curbei de autooxidare. În schimb George și Robertson [19] studiind autooxidarea tetralinei catalizată de stearat feric au observat un efect inhibitor al ionilor de cupru (fig. 3.6. B). Acțiunea ionilor metalici asupra peroxidării a produs o acumulare de date contradictorii [15, 33, 61]; conclu-

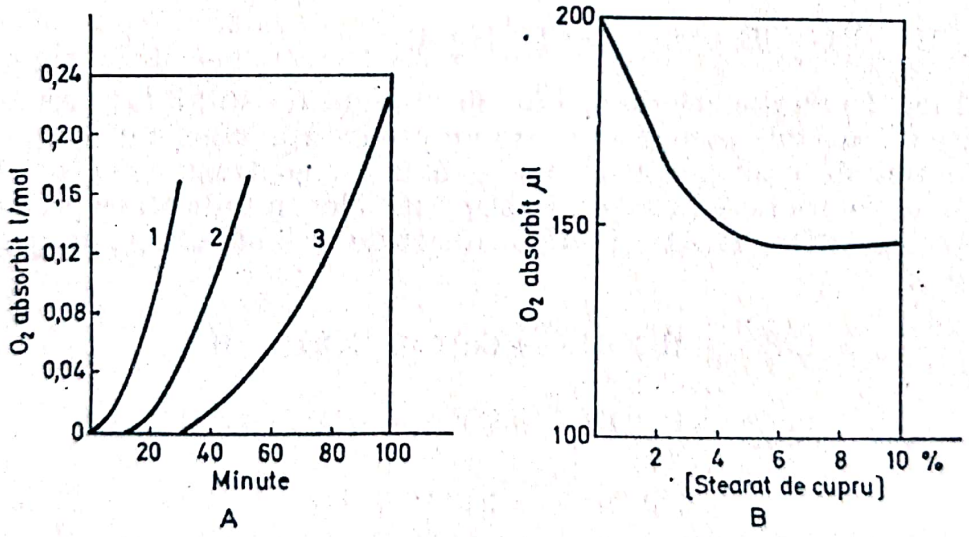


Fig. 3.6. A. Autooxidarea tetralinei în prezența acetatului de cobalt în concentrații variate: (1) 0,005 *M*, (2) 0,002 *M*, (3) 0,001 *M*. B. Efectul stearatului de cupru asupra oxidării tetralinei la 110°C [19].

zia finală ar fi că metalele acționează multifuncțional asupra substratelor peroxidabile, afectînd nu numai descompunerea hidroperoxizilor, dar pot crește sau micșora viteza propagării în lanț. Natura ionilor metalici influențează efectul catalitic. Cu^{2+} este un catalizator activ numai în pre-

Scanned with OKEN Scanner

zența unui peroxid sau a unui agent reducător pentru a asigura un flux continuu de electroni. Fe^{2+} poate produce radicali liberi atît de instabili încît aceștia nu au timp suficient de a iniția reacții de peroxidare.

Formarea unui complex labil între ionul metalic și O_2 de forma:

$$M^{n+} + O_2 \rightarrow M^{n+}OO\cdot \xrightarrow{RH} ROOH + M^{n+} \qquad (11)$$

asigură activarea O_2 și producerea peroxizilor necesari inițierii peroxidării și propagării reacției în lanț. Dealtfel recent au fost identificate forme activate ale O_2 (singlet) în urma descompunerii unor peroxizi [22]. Rawls și Santen [47] au observat că în prezența singletului, $^1O_2$, peroxidarea metil linoleatului decurge de 10^4 ori mai repede decît în atmosferă de O_2. Pe de altă parte, Michelson [36] reluînd mecanismul autooxidării ionilor Fe^{2+} (capitolul 1) a găsit că în realitate se produce superoxid $O_2^{-\cdot}$, care rămîne atașat de Fe^{2+} sub forma complexă de ioni pereche. În prezența unor anioni cum ar fi F^-, $P_2O_7^{4-}$ sau OH^- se va produce o stabilizare a acestei forme activate de oxigen

$$Fe^{2+} + O_2 \rightleftharpoons Fe^{3+}\ldots O_2^{-\cdot} \xrightarrow{OH^-} Fe^{3+}\ldots O_2^-\ldots HO^-. \qquad (12)$$

Ionii Ni^{2+} și CO^{2+} au o comportare asemănătoare. Cum formarea unui peroxid necesită o energie de activare mare (35—65 kcal/mol), devine evidentă necesitatea unei etape de micșorare a acestei energii, așa cum ar fi activarea oxigenului sub formă de $O_2^{-\cdot}$ sau $^1O_2$. O confirmare a acestei ipoteze constă și în efectul inhibitor asupra peroxidării lipidelor exercitat de enzima superoxid dismutază, care neutralizează $O_2^{-\cdot}$ prin catalizarea reacției de disproporționare: $O_2^{-\cdot} + O_2^{-\cdot} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$.

Complexarea Fe^{2+} sau Fe^{3+} în porfirine și formarea hemoproteinelor crește mult peroxidarea lipidelor din țesuturi sau a acizilor grași nesaturați [31]. Recent, Okatsu și Teiji [41] au obținut autooxidarea unor hidrocarburi prin acțiunea catalizatoare a unui complex Co^{2+} cu tetraporfirine, identificînd totodată și formarea $O_2^{-\cdot}$. Unele discrepanțe în comunicările asupra acțiunii catalizatoare a ionilor metalici asupra peroxidării substanțelor organice pot fi explicate, cel puțin pentru medii biologice, prin efectul concentrației ionilor. Lewis și Wills au arătat că hemoglobina catalizează autooxidarea lipidelor doar în domeniul concentrației de 10^{-6}M. La concentrații mai mari se obțin din contra inhibiția aproape totală a peroxidării.

Groves și Van Der Puy [21] au demonstrat valaditatea mecanismului prooxidant al ionului Fe^{3+} în amestec cu H_2O_2 pe ciclohexanol și 7-norborneol. Prin studii de rezonanță magnetică nucleară și spectrometrie de masă ei au arătat că hidroxilarea alifatică sub acțiunea Fe^{3+} și H_2O_2 decurge în etape de reducere a unui electron, de formare a ionului hidroxil $OH\cdot$ și stereospecifică atacului acestui radical. O schemă ipotetică a mecanismului de reacție este prezentată în fig. 3.7.

OZONUL este un constituent important al atmosferei și în anumite condiții are un rol prooxidant puternic. La concentrația normală din at-

Scanned with OKEN Scanner

mosferă, aproximativ 10 părţi la 100 milioane, ozonul poate iniţia peroxidarea unor hidrocarburi sau aldehide [10] producînd doi radicali:

$$RH + O_3 \rightarrow RO\cdot + \cdot OOH \qquad (13)$$

Se pare că este necesară prezenţa şi altor factori externi, cum ar fi căldura şi razele ultraviolete, deoarece concentraţii mari de ozon pot inhiba autooxidarea hidrocarburilor cu masă moleculară medie [52]. Ozonul poate iniţia autooxidarea alcanilor, aldehidelor şi a unor hidrocarburi, izolîndu-se în multe cazuri hidroperoxizi intermediari [20].

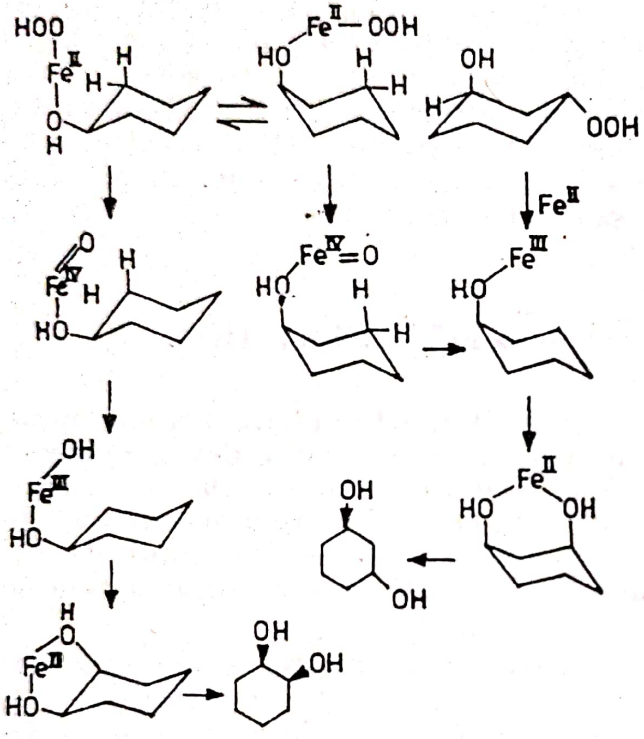


Fig. 3.7. Formarea unor hidroperoxizi în cursul hidroxilării ciclohexanolului; reprezentarea complecşilor stereoizomerici [21]

Acţiunea prooxidantă a radiaţiilor ultraviolete şi a fotosensibilizatorilor va fi prezentată în capitolul 4.

B. Al doilea mecanism prooxidant acţionează asupra vitezei de propagare a reacţiei în lanţ şi are o aplicativitate limitată. Acizii carboxilici cum ar fi fenilacetic, butiric posedă o activitate catalitică în autooxidarea difenilmetanului şi a altor compuşi aromatici [26, 39].

Acidul bromhidric prezintă un efect cunoscut de abatere de la regula lui Markovnikov în cazul adiţiei la olefine avînd o grupă marginală $=CH_2$, în prezenţa luminii, O_2 şi a urmelor de peroxizi. Mecanismul acestei reacţii este de tip homolitic şi presupune formarea atomilor de brom liberi alături de radicalii peroxi [65]. HBr creşte viteza autooxidării unor hidrocarburi şi cetone izolîndu-se hidroperoxizi intermediari. Se pare că acţiunea $Br^\cdot$ se datoreşte scăderii energiei de activare, dar şi formării radicalului alchilperoxi şi reducerii lui în hidroperoxid evitînd implicarea lui în reacţii secundare:

$$\text{—CH—} + HBr \rightarrow \text{—}\dot{C}\text{—} \xrightarrow{O_2} \text{—}COO\cdot \xrightarrow{HBr} \text{—}COOH$$

Scanned with OKEN Scanner

3.4. EPOXIZI

De mult timp se cunoaşte că acidul perbenzoic şi alţi peracizi pot reacţiona cu olefinele cedîndu-le un atom de oxigen care se adiţionează la dubla legătură formînd epoxizi, conform ecuaţiei:

$$-C=C- + C_6H_5OOOH \rightarrow -\underset{\diagdown O \diagup}{C-C}- + C_6H_5OOH \qquad (14)$$

Practic, prin folosirea unui amestec de peroxid de hidrogen şi acid formic se obţin prin oxidarea olefinelor glicolii corespunzători. În urma lucrărilor lui Mayo [34] s-a găsit că apariţia epoxizilor unor hidrocarburi nesaturate presupune formarea intermediară a peroxizilor conform schemei din fig. 3.8. A, după care β-di-izobuten epoxidul se formează prin autooxidarea β-di-izobutenei, catalizată de peroxizi, în care prima reacţie constituie etapa dominantă a întregului proces.

Mayo şi Miller [35] au studiat formarea epoxizilor în cursul autooxidării stirenului şi au găsit-o strîns legată de presiunea parţială a O_2. La presiuni mai mari de 20 mm viteza autooxidării este practic independentă de presiunea O_2, procesul terminîndu-se prin reacţii de descompunere a peroxizilor. Pe măsură ce presiunea O_2 scade, creşte ponderea reacţiilor de ramificare (3.2.c), pentru ca în lipsa O_2 să predomine polimerizarea de tip vinilic. Autorii au mai arătat că stiren oxidul nu este un produs major al descompunerii stiren poliperoxidului, ambii produşi provenind din disproporţionarea radicalilor poliperoxi (fig. 3.8.B). Reacţia de sciziune (B) are loc în urma alternanţei unităţilor de monomer şi peroxid de-a lungul lanţului. În general formarea epoxizilor şi a poliperoxizilor sînt complimentare formării hidroperoxizilor. Conjugarea favorizează adiţia radicalilor alchilperoxi la dubla legătură nefavorizînd formarea unui epoxid printr-o competiţie pentru electroni [57]. Olefinele care produc prin autooxidare radicali liberi prin adiţia radicalilor alchilperoxi la dubla legătură vor forma uşor epoxizi, iar atacul O_2 va fi dezavantajat în favoarea formării epoxizilor.

Reacţiile de formare a epoxizilor pot fi modificate prin intervenţia peroxizilor cum ar fi apariţia ciclului furan în cursul oxidării butadien (fig. 3.8. C) şi a parafinelor la temperaturi mari (fig. 3.8. D) [50].

Prezenţa intermediarilor peroxizi în cursul formării epoxizilor nu s-a dovedit a fi un mecanism general, deşi date recente [48, 64] au dovedit apariţia singletului $^1O_2$ în producerea epoxizilor unor olefine [25].

Asocierea epoxizilor cu peroxizii pare să existe şi în mediu biologic, unde după unele lucrări [46, 60] se demonstrează formarea epoxizilor în cursul metabolizării hidrocarburilor cancerigene (benzopiren) de către sistemele enzimatice din microzomii hepatici. Or în cursul metabolizării compuşilor aromatici de către acest sistem detoxifiant existent în microzomii hepatici apar intermediari peroxizi [40, 42]. De asemenea vitamina K_3 (menadiona) se metabolizează cu formarea unui epoxid în urma acţiunii catalazei şi a H_2O_2 [43]. În partea a doua a cărţii vom prezenta ipoteza efectului carcinogenic al peroxizilor mediat prin epoxizi.

Scanned with OKEN Scanner

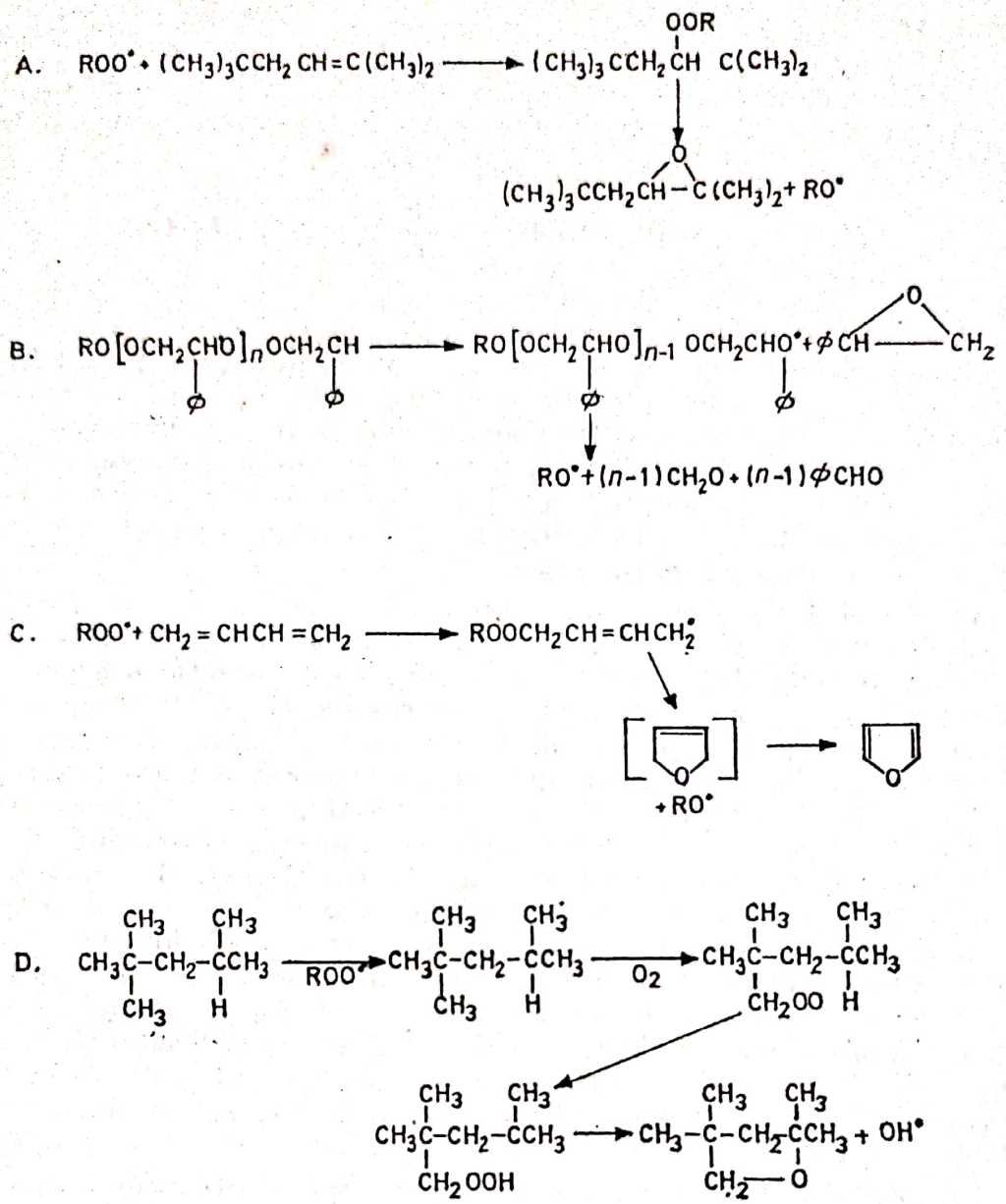


Fig. 3.8. Exemple ale unor reacții în care peroxizii sînt implicați în formarea epoxizilor. (Explicații în text)

BIBLIOGRAFIE

1. Y. A. ALEXANDROV, A. N. BRYHKAN, *J. Obșcei. Khim.*, **45**, 2347 (1975).
2. G. P. ARMSTRONG, R. H. HALL, *J. Chem. Soc.*, 666 (1950).
3. R. G. BACON, *Quart. Rev.*, **9**, 287 (1955).
4. L. BATEMAN, H. HUGHES, *J. Chem. Soc.*, 4595 (1952).
5. L. BATEMAN, *Quart. Rev.*, **8**, 147 (1954).
6. L. BATEMAN, J. I. CUNNEEN, *J. Chem. Soc.*, 1596 (1955).
7. G. O. BAYDASARIAN, *Dokladî Akad. Nauk CCCP*, **231**, 362 (1976).
8. E. L. BELL, J. H. RALEY, F. RUST, *Discuss. Faraday Soc.*, **10**, 242 (1951).

Scanned with OKEN Scanner

9. E. M. BEVILAQUA, *Rubber, Chem. Technol.*, **30**, 667 (1957).
10. C. BRINER, *Advan. Chem. Ser.*, **21**, 184 (1958).
11. R. CRIEGEL, H. PILZ, H. FLYARE, *Ber.*, **72**, 1799 (1939).
12. M. H. DEAN, G. SIRROW, *Trans. Faraday Soc.*, **54**, 849 (1958).
13. J. B. DE SOUSA, S. K. HO, *Nature*, **186**, 776 (1960).
14. N. M. EMANUEL, Y. N. LYASKOVSAIA, „The inhibition of fat oxidation processes" Pergamon Press, Oxford, 1967.
15. J. G. ENDRES, V. B. BHALERAO, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **39**, 118, 159 (1962).
16. R. N. FAULKNER, *J. Appl. Chem.*, **8**, 448 (1958).
17. C. H. FARMER, D. A. SUTTON, *J. Chem. Soc.*, 10, (1946).
18. E. J. GASSON, G. E. HAWKINS, D. C. QUIN, *J. Chem. Soc.*, 2798 (1950).
19. P. GEORGE, A. ROBERTSON, *J. Inst. Petrol.*, **32**, 382 (1946).
20. D. D. GRANT, C. F. TIPPER, *J. Chem. Soc.*, 640 (1955).
21. J. T. GROVES, M. VAN DER PUY, *J. Am. Chem. Soc.*, **98**, 5290 (1976).
22. K. D. GUNDERMANN, M. STEINFETT, *Angew. Chemie Ind. Ed.*, **14**, 560 (1975).
23. D. C. HENDRY, C. W. GOULD, *Prep. Am. Chem. Soc.*, **19**, 636 (1974).
24. L. HORNER, O. H. BASEDOW, *Ann. Chem.*, **61**, 108 (1958).
25. Y. P. JUREV, L. V. SPIRIKLIN, *J. Obșcei. Khim.*, **145**, 2312 (1975).
26. M. S. KHARASCH, *J. Org. Chem.*, **15**, 775 (1950).
27. M. S. KHARASCH, A. FONO, W. NUDENBERG, *J. Org. Chem.*, **15**, 748, 753 (1950).
28. M. S. KHARASCH, A. FONO, W. NUDENBERG, *J. Org. Chem.*, **16**, 113 (1951).
29. J. KONO, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **186**, 189 (1978).
30. Y. KUROSAWA, A. TAKADA, *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 375 (1975).
31. S. E. LEWIS, E. D. WILLS, *Biochim. Biophys. Acta*, **70**, 336 (1963).
32. J. E. LIER, J. ROUSSEAU, *Biochim. Biophys. Acta*, **487**, 395 (1977).
33. W. O. LUNDBERG, „Autoxidation and Antioxidants" vol. I, Interscience, New York, 1961.
34. F. R. MAYO, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2497 (1958).
35. F. R. MAYO, A. A. MILLER, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2480 (1958).
36. A. M. MICHELSON, în „Superoxide, Superoxide Dismutase" edit. A.M. Michelson, J. McCord, I. Fridovich, Academic Press, London, 1977 p. 77.
37. N. A. MILAS, D. M. SURGENOR, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 2500 (1958).
38. E. MULLER, K. LEY, *Chem. Ber.*, **87**, 922 (1954).
39. C. D. NENITESCU, „Tratat Elementar de Chimie Organică" vol. I Editura Tehnică, București, 1956 p. 210, 414.
40. G. D. NORDBLUM, M. J. COON, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **31**, 343 (1977).
41. J. OKATSU, T. TEIJI, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **51**, 188 (1978).
42. F. OLESCH, H. SCHASSMAN, *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 17 (1978).
43. R. OLINESCU, *Rev. Roum. Biochim.*, **5**, 287 (1968).
44. G. E. PUSTNARKOVA, V. M. SALYANOV, *Bull. Akad. Nauk. CCCP*, **24**, 4723 (1975).
45. J. H. RALEY, F. F. RUST, *Ind. Eng. Chem.*, **4**, 2595 (1949).
46. W. H. RASTELTER, *J. Org. Chem.*, **43**, 3163 (1978).
47. H. R. RAWLS, P. J. VAN SANTEN, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **171**, 135 (1971).
48. J. RIBEK, S. F. WOLF, *Diss. Abstr. Int. B*, **38**, 3702 (1978).
49. C. A. RUSSELL, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 4583 (1955).
50. F. F. RUST, D. O. COLLAMER, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1055 (1954).
51. J. SAWAKI, Y. OGATA, *J. Org. Chem.*, **41**, 2340 (1976).
52. C. C. SCHUBERT, R. N. PEASE, *J. Chem. Phys.*, **24**, 319 (1956).
53. G. SCOTT, „Atmospheric Oxidation and Antioxidants" Elsevier, Amsterdam, Chap. 3 1965.

Scanned with OKEN Scanner

54. H. H. SEPHTON, D. A. SUTTON. *Chem. Ing. London*, 667 (1953).
55. J. M. SHREEVE, *Endeavour* **35**, 78 (1976).
56. V. STANNETT, R. B. MESROBIAN, *Discuss. Faraday Soc.*, **14**, 242 (1953).
57. C. E. SWIFT, R. I. O'CONNOR, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **26**, 297 (1949).
58. J. R. THOMAS, O. L. HARLE, *J. Phys. Chem.*, **63**, 1027 (1959).
59. A. V. TOBOLSKI, R. B. MESROBIAN, „Organic Peroxides" Interscience, New York, Chap 2, 1954.
60. W. TREIBS, *Ber.*, **75B**, 953 (1942).
61. N. URI, *Nature* (London), **177**, 1177 (1956).
62. J. E. VALLEE, D. B. GLASS, *J. Am. Chem. Soc.*, **57**, 4279 (1948).
63. A. E. WOODWARD, R. B. MESROBIAN, *J. Am. Chem. Soc.*, **75**, 6189 (1953).
64. S. F. WOLF, *Discuss., Abstr. Int. B*, **38**, 3702 (1978).
65. K. WYNZEL, D. DAHLMANN, *J. Prakt. Chem.*, **318**, 390 (1976).
66. N. YANISHLEVA, H. K. MANGOLD, *Chem. Phys. Lipids*, **20**, 21 (1977).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 4

ACȚIUNEA RADIAȚIILOR UV ȘI IONIZANTE

4.1. REACȚII DE FOTOOXIDARE

Acțiunea catalitică a radiațiilor ultraviolete (UV) asupra unor reacții chimice este cunoscută de multă vreme, fiind frecvent folosită în chimia organică preparativă (exemplu clorurări, polimerizarea unor polimeri). După cum se observă în fig. 4.1, conținutul energetic al unor legături chimice este în strînsă legătură cu energia potențială furnizată de radiațiile emise de soare (vizibil și UV). Prezența unor astfel de legături chimice

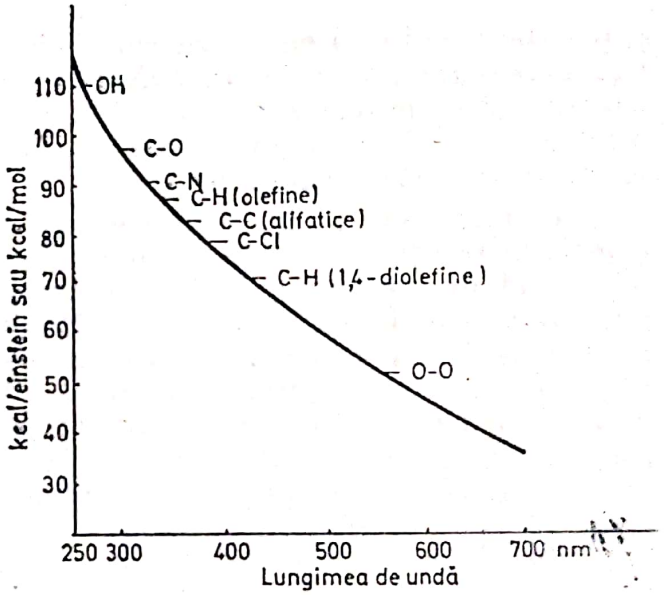


Fig. 4.1. Energiile disocierii legăturilor și energiile de activare ale dublei legături pentru unele grupări chimice prezente în medii autooxidante [39].

într-o grupare chimică a unei substanțe o labilizează prin expunere la acțiunea luminii. De exemplu, gruparea carbonil, frecvent întîlnită printre produșii de oxidare ai substanțelor autooxidabile, constituie un cromofor important.

Mecanismul fotooxidărilor se cunoaște și o schemă generalizată este prezentată în fig. 4.2. Astfel, în urma captării unei cuante de energie radiantă molecula S a unei substanțe trece într-o stare excitată singlet ^1S, care durează un timp foarte scurt (o milionime de secundă), după care în mod normal energia captată este reemisă sub formă de căldură sau ca energie electromagnetică cu o lungime de undă mai mică (fig. 4.2 b). În cazul cînd structura substanței S permite o rearanjare structurală internă, aceasta trece într-o altă stare excitată-triplet ^3S cu o durată ceva mai lungă. În această stare molecula substanței S poate iniția reacții foto-

Scanned with OKEN Scanner

chimice de tip I sau II (fig. 4.2 *a*). Reacţiile ce decurg pe calea (c) sînt de tipul I sau FOTOSENSIBILIZĂRI, deoarece substanţa *S* (fotosensibilizator) posedă o structură favorabilă captării luminii şi poate sensibiliza o altă substanţă RH. Reacţiile fotochimice de tipul I iniţiază reacţii cu producere de radicali liberi prin transfer de electroni sau hidrogen atomic

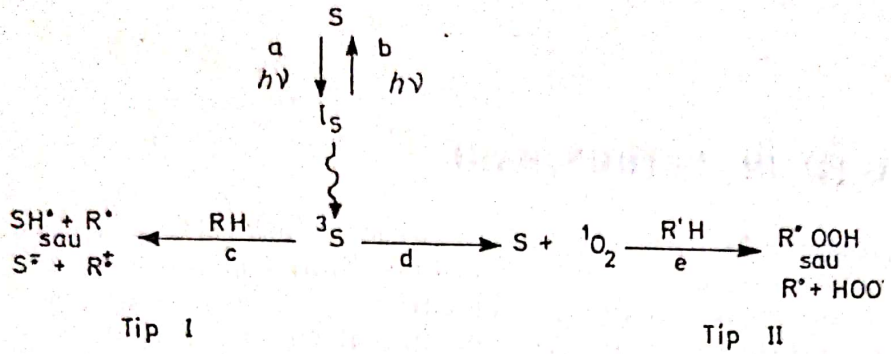


Fig. 4.2. Mecanismul şi clasificarea proceselor de foto-oxidare. (Explicaţii în text)

şi pot decurge în absenţa oxigenului. Reacţiile fotochimice de tip II (fig. 4.2. d) se mai numesc şi FOTOOXIGENĂRI în care transferul de energie este acceptat de oxigenul molecular, care trece în stare de singlet, $^1O_2$, iar substanţa *S* poate suferi o autooxidare în urma acţiunii oxigenului în stare excitată singlet, $^1O_2$.

În multe cazuri nu se poate face o distincţie clară între cele două tipuri de reacţii fotochimice, coexistînd ambele căi, ponderea fiecăreia depinzînd de condiţiile locale (structura substanţelor, impurităţi), cît şi posibilitatea unor reacţii secundare. Produşi intermediari de tipul peroxizilor pot apare în ambele căi aşa cum este exemplul α-pinenului care prin expunere la lumină produce peroxizi cu structuri diferite în funcţie de prezenţa eozinei ca fotosensibilizator (fig. 4.3. a). Formarea hidroperoxidului în prezenţa eozinei nu este posibilă printr-un mecanism implicînd producerea unor radicali liberi ci presupune o prealabilă adiţie a O_2 la dubla legătură urmată de pierderea unui atom de hidrogen conform mecanismelor prezentate în capitolul 2.

După Schenck [60] unii fotoactivatori ca fluoresceina, eozina ş.a. sînt activaţi de către radiaţiile UV în starea triplet, care este apoi capabilă să transfere energia absorbită oxigenului (fig. 4.3. B). Acest mecanism presupune formarea intermediară a unui peroxid în urma unui atac asupra dublei legături şi a unei migrări de proton.

Intermediarii fotoactivaţi conţin mai multă energie decît cei implicaţi în procesele de autooxidare descrise mai înainte. De exemplu oxidarea fotocatalizată a 1,4-dienelor produce numai 1- sau 5-hidroperoxizi cu modificarea structurii numai la o dublă legătură [34], pe cînd prin folosirea clorofilei ca fotoactivator mai apare şi 3-hidroperoxid, predominînd formele *trans-trans*. Oxidarea fotoactivată implică, în general, aceleaşi etape ale unui proces de reacţii în lanţ ca şi autooxidarea produsă la întuneric. Diferenţa esenţială pare să fie în natura etapei iniţiale şi în viteza părţii liniare a curbei de autooxidare. Lumina produce în primul rînd o

Scanned with OKEN Scanner

scădere mare a perioadei de inițiere, accelerînd viteza de atingere a autooxidării maxime. În multe cazuri viteza de autooxidare în prezența luminii este constantă de la începutul procesului [78].

De asemenea, se pare că autooxidarea catalizată de radiațiile UV nu are loc (în absența unui fotoactivator) dacă nu există un cromofor prezent în substrat. Apariția unei grupări cromofore, cum ar fi carbonilul,

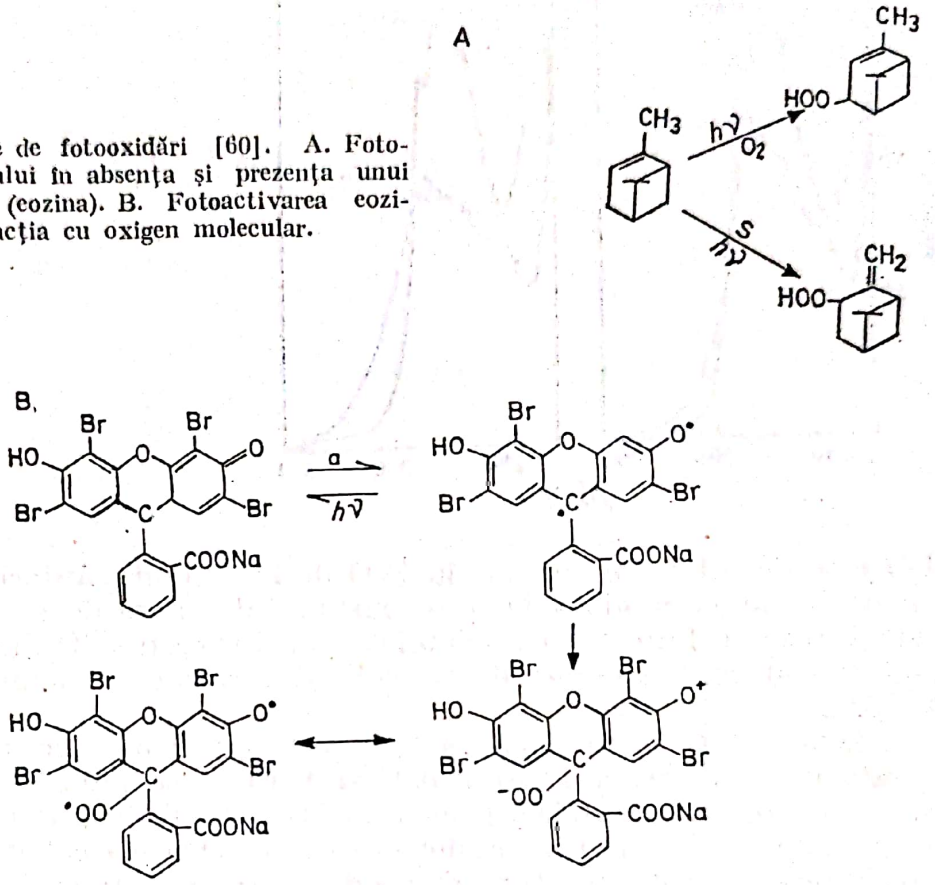


Fig 4.3. Exemple de fotooxidări [60]. A. Fotooxidarea α-pinenului în absența și prezența unui fotosensibilizator (eozina). B. Fotoactivarea eozinei și reacția cu oxigen molecular.

mai ales în urma descompunerii unui hidroperoxid, a unei scindări homolitice, este esențială pentru apariția unei autooxidări fotoactivate, așa cum a fost demonstrat în cazul ciclohexenului prin observarea unui maxim la 235 nm caracteristic unui hidroperoxid [7].

Din marea categorie a reacțiilor fotochimice, reacțiile de fotooxidare în care sînt implicați peroxizii ca produși intermediari reprezintă doar o parte încă insuficient delimitată (15, 74). Dacă implicarea peroxizilor în reacțiile fotooxidative este încă insuficient cunoscută, în schimb rolul oxigenului în formă de singlet este unanim acceptat, cu toată existența unor probleme dificile (solubilitate, reacție cu sensibilizatori excitați, sensibilitatea acceptorilor la peroxizi și alți radicali [6, 78], care creează mari obstacole în determinarea implicării $^1O_2$. În afara metodelor pentru detecția $^1O_2$ descrise în capitolul 1, în special cele bazate pe rezonanță electronică de spin (RES) [32], Nilsson și colaboratorii [46] au introdus o metodă originală bazată pe faptul că viața $^1O_2$ este extrem de sensibilă la natura solventului și că există o corelație directă între viața $^1O_2$ și intensitatea absorbției în infraroșu a solventului normal și în stare deuterată.

Scanned with OKEN Scanner

Compararea vieții $^1O_2$ în H_2O (prin această metodă, de 2 μsecunde) cu cea în D_2O indică o creștere cu un factor de 9. Prin compararea vitezelor de oxidare a triptofanului, prin fotosensibilizare cu albastru de metilen, în H_2O și D_2O (fig. 4.4) se observă că viteza decolorării triptofanului în

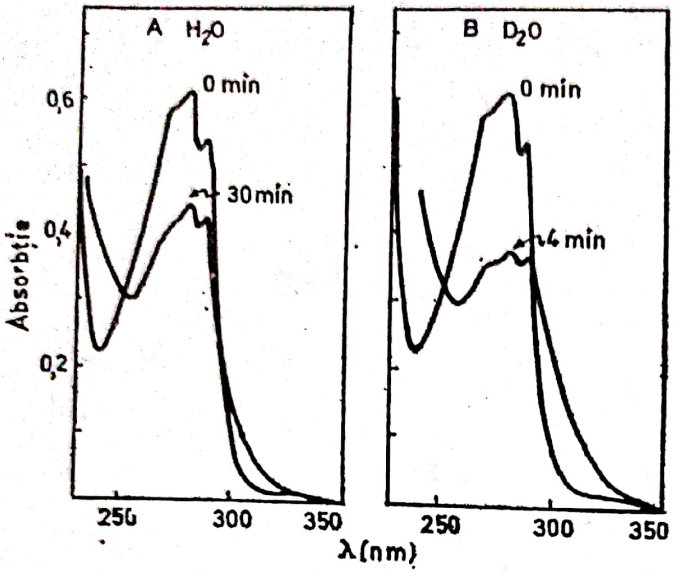


Fig. 4.4. Decolorarea produsă de triptofan ($10^{-4}M$) în urma reacției cu albastru de metilen ($2 \cdot 10^{-6}M$) în soluții aerate de H_2O (stînga) și D_2O (dreapta). După Nilsson [46].

H_2O este de 0,1% /minut, iar în D_2O de 1%/minut. Autorii au calculat o viață de 20 μsecunde a $^1O_2$ și o constantă de viteză de 4×10^6 $M^{-1} \cdot s^{-1}$ pentru reacția fotooxidării triptofanului. Generarea $^1O_2$ în fotooxidări implică transferul energiei de la molecula organică în stare excitată la O_2 [31].

Oxigenul în stare singlet a fost evidențiat mai ales în fotooxigenări, în care de asemenea au fost izolați și peroxizi ca produși intermediari. La rîndul lor, substanțele organice care pot fi substraturi pentru reacții de fotooxigenare se împart în două categorii. O primă categorie cuprinde substanțe ce conțin structuri *cis*-1,3-dien, compuși aromatici ca antracen și heterocicli ca furani. Produșii finali cuprind peroxizi ciclici rezultați în urma unei adiții 1—4, asemănătoare reacției Diels-Alder (fig. 4.5.A). Un exemplu de fotooxigenare din această categorie îl constituie dimetilfuranul (fig. 4.5. B) care după ce trece printr-o ozonidă instabilă se transformă în final în 2,5-dimetil-5-hidroperoxi-dihidrofuran [26]. Fotooxigenarea antracenului a fost mult studiată [10, 39], observîndu-se un efect important al solventului. În timp ce în sulfură de carbon, cloroform, brombenzen singurul produs al fotooxigenării antracenului este un peroxid, în tetraclorură de carbon apar reacții secundare cu solventul ducînd la compuși halogenați instabili. În cazul primilor solvenți randamentul cuantic al formării peroxidului φ_{perox} este în funcție de concentrația antracenului [A], conform formulei (1):

$$\varphi_{perox} = (\varphi_{max} \cdot [A])/(\beta + [A]) \qquad (1)$$

în care φ_{max} reprezintă valoarea maximă a randamentului cuantic, infinită, și principial ar trebui să depindă de concentrația oxigenului. Pentru CS_2, φ_{max} și β sînt respectiv 0,70 și $3,6 \cdot 10^3$, iar pentru $CHCl_3$ de 0,54 și

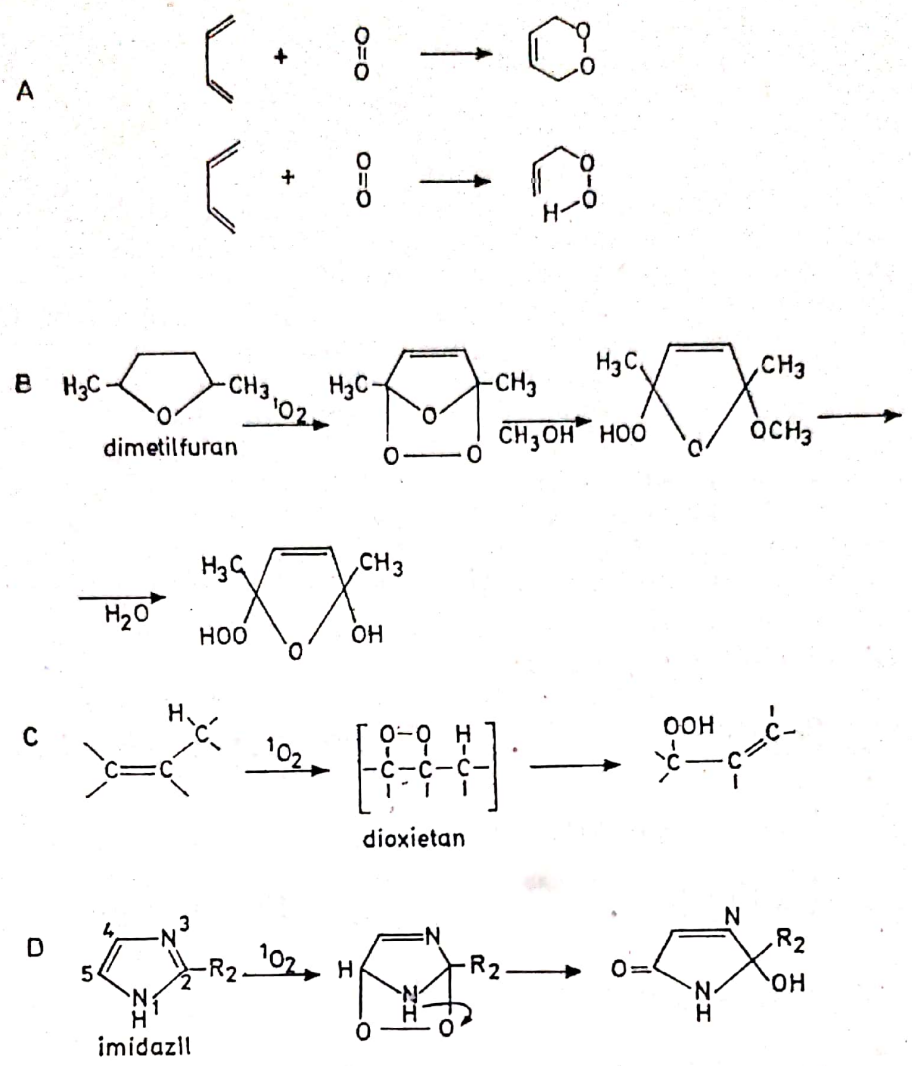


Fig. 4.5. Exemple de reacţii de fotooxigenare

$12{,}5 \cdot 10^3$ [60]. Formula (1) se aplică în multe cazuri cum ar fi fotooxigenarea rubrenului [39], acenaftenului [38]. În schimb benzenul, toluenul, cumenul, xilenul cu derivaţii lor prin fotooxigenare deşi produc hidroperoxizii respectivi într-o primă etapă, mai apar şi altfel de radicali liberi cum ar fi tolil în urma reacţiei:

$$C_6H_5CH_3 + h\nu \rightarrow C_6H_5\dot{C}H_2 + H\cdot \qquad (2)$$

Pe lîngă aceşti radicali liberi mai apar alţii rezultaţi din fotodisocierea hidroperoxizilor formaţi iniţial. Această acumulare de radicali induce o autooxidare prin proces în lanţ (capitolul 2), produşii finali fiind acizi carboxilici [55].

O a doua categorie a reacţiilor de fotooxigenare grupează olefine ce conţin atomi de hidrogen alilici (capitolul 2). Prin fotooxigenare aceste substanţe produc hidroperoxizi, în care dubla legătură iniţială s-a deplasat în poziţia alil asemănător unei reacţii de tip „enă" (fig. 4.5.C). Reamintim

că energia de disociere a legăturii C—H din poziția alilică este mult mai mică (77 kcal/mol) decît în cazul unei legături normale (95,5 kcal/mol), iar radicalul alil ce se formează are o mare stabilitate datorită conjugării electronului impar al radicalului cu electronii π ai dublei legături.

Prin fotooxigenare, monoolefinele, compușii 1,4-dien produc într-o primă etapă α-hidroperoxizi. Poliizoprenii produc peroxizi ciclici și polimerizați. Ca și în cazul compușilor înrudiți structural cu benzenul, prin fotooxigenarea olefinelor apar și radicali liberi rezultați prin expulzarea unui atom de hidrogen, care pe lîngă radicalii rezultați prin fotodisocierea hidroperoxizilor inițiază o autooxidare printr-un proces în lanț. Randamentul cuantic este mai mare decît unitatea, reacțiile sînt dependente de temperatură și invers proporționale cu rădăcina patrată a intensității luminii absorbite [39]. Astfel de reacții au fost studiate pe hexen și derivați [7], esteri ai acizilor grași nesaturați [8], cauciuc natural [27]. Hidroperoxizii apăruți în fotooxigenările aldehidelor suferă o descompunere cu producere în final de acid carboxilic [39]. După Steacie [69] și Moore [43] mecanismul de reacție generalizat ar fi următorul:

$$R{-}CHO + h\nu \xrightarrow{k_1} R\cdot + CHO\cdot$$

$$R\cdot + O_2 \xrightarrow{k_2} ROO\cdot \qquad (3)\ \text{Reacții de inițiere în lanț}$$

$$R{-}CHO + ROO\cdot \longrightarrow RCO\cdot + ROOH$$

$$RCO\cdot + O_2 \xrightarrow{k_5} RCO_3^{\cdot} \qquad (4)\ \text{Reacții de propagare în lanț}$$

$$RCO_3^{\cdot} + R{-}CHO \xrightarrow{k_3} RCO_3H + RCO\cdot$$

$$2\ RCO_3 \xrightarrow{k_4} \text{produși inerți} \qquad (5)\ \text{Reacții de terminare}$$

Etapa care controlează întreg procesul fotochimic este reacția a cărui constantă este k_3. Viteza de reacție a întregului proces R_u este dată de relația (6), în care R_i este viteza etapei inițiale și este direct proporțională cu intensitatea luminii UV, independent de temperatură.

$$R_u = k_3(R_i/k_4)^{1/2}\ [\text{compus}] \qquad (6)$$

Marea varietate a reacțiilor fotochimice în care este implicat $^1O_2$ se datoresc nu diferitelor căi de atac a speciilor excitate, ci mai de grabă multiplelor căi de descompunere a hidroperoxizilor intermediari. Aceste descompuneri secundare sînt mult dependente de natura substratului, a grupărilor funcționale, a mediului, temperaturii etc. În cazul unor heterocicli, dacă un proton este atașat unor atomi de carbon implicați în legătura peroxi (C_2 și C_5, fig. 4.5. D), se produce într-o etapă ulterioară o eliminare prin scindarea legăturii O—O și formarea unor grupări carbonil și alcool. Astfel pirolii se transformă pe această cale în epoxicetone, imidazolii în enamine [83].

Scanned with OKEN Scanner

4.2. REACȚII DE FOTOSENSIBILIZARE

Dacă în cazul fotooxigenărilor, implicarea $^1O_2$ și a peroxizilor ca intermediari este unanim admisă, pentru reacțiile de fotosensibilizare (RFS) nu s-a ajuns încă la o clasificare acceptată și nici la o delimitare clară a multiplelor posibilități observate. Scopul acestei prezentări nu este de a trata RFS în totalitate, ci doar de a delimita reacțiile în care s-a evidențiat clar prezența peroxizilor. Din multele și variatele mecanisme și tratamente matematice propuse [18, 45, 76, 78] prezentăm schema dată de Rizzuto și Spikes [58] în fig. 4.6, care ilustrează multiplele căi existente în RFS. Astfel, un sensibilizator în stare triplet, T, poate reacționa cu oxigenul în stare fundamentală printr-un transfer de energie în care este implicat $^1O_2$ producînd transformarea sensibilizatorului în stare fundamentală S, (k_8) sau semioxidată X, (k_{13}). În continuare sensibilizatorul poate induce autooxidarea unui substrat A, sau poate fi inhibat prin reacție cu un inhibitor Q (*quencher*) specific reacțiilor cu radicali liberi. O a doua ramură cuprinde reacții ce decurg după mecanismul $D-D$ (*dye-dye*), în care sensibilizatorul, de multe ori un colorant, în stări excitate (singlet sau triplet) induce fotooxidarea unui substrat A în starea oxidată A_{ox}. A treia ramură cuprinde reacții fotosensibilizante directe între sensibilizator și un substrat A sau un inhibitor Q după un mecanism ce implică pierderea unui atom de hidrogen (mecanism $D-R$). R reprezintă sensibilizatorul în stare semiredusă, deci sub formă de radical. O ultimă ramură a RFS o constituie reacțiile catalizate de ioni metalici, în special Fe^{3+}. Deoarece aproape toate RFS decurg în prezența oxigenului, formarea $^1O_2$ sau a superoxidului $O_2^{\cdot-}$ a fost semnalată în toate ramurile RFS prezentate.

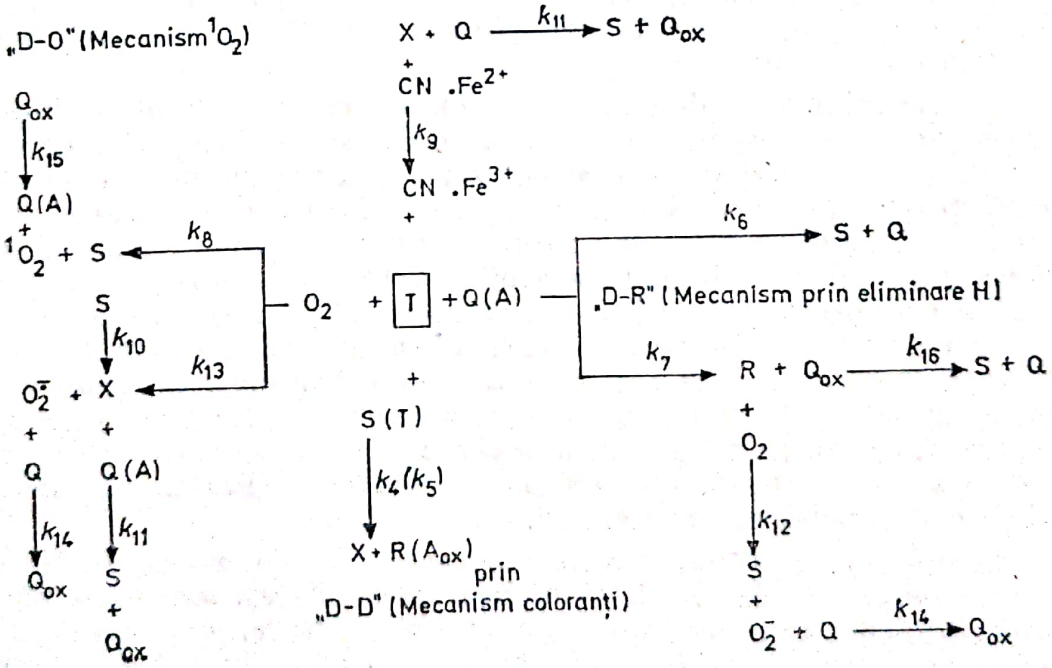


Fig. 4.6. Schema ipotetică a diferitelor mecanisme implicate în reacții de fotosensibilizare. *S*, *T*, *X* și *R* includ formele fundamentale, triplet, semioxidată și semiredusă ale fotosensibilizatorului. Substratul este notat cu *Q* sau *A*, $CN \cdot Fe^{2+}$ indică ferocianură [58].

Ca și în cazul fotooxigenărilor, prezența $^1O_2$ în RFS este mai mult o chestiune de tehnică; această problemă fiind, dealtfel, de mare actualitate [74, 76]. Așa cum s-a arătat în fig. 4.1. prin absorbția luminii UV de către o substanță, aceasta trece într-o stare excitată triplet, notată ^3S sau $^3S_1$. O primă acțiune a oxigenului molecular ar fi producerea stării singlet $^1S_0$ (stare fundamentală-singlet) a substanței S, dar și $^1O_2$.

$$^3S + O_2 \xrightarrow{k_1} {}^1S_0 + {}^1O_2 \qquad (7)$$

Ecuația (7) va decurge în paralel cu (8), dintre sensibilizatorul S și substratul oxidabil A

$$^3S + A \xrightarrow{k_2} {}^1S_0 + A \text{ sau } A_{ox} \qquad (8)$$

dar și cu reacția de dispariție a $^1O_2$ (9) sau a ^3S ori $^1S_0$ [10]

$$^1O_2 \rightarrow {}^3O_2 \qquad (9)$$

$$^3S \rightarrow S \qquad (10)$$

Ținînd seama de diferențele în măsurători datorită diversității tehnicilor existente [16], a unei insuficiente fundamentări teoretice, nu este de mirare că tratamentul matematic al RFS este foarte diversificat și complex chiar și asupra definirii randamentului cuantic [7, 45].

Deoarece natura sensibilizatorului influențează foarte mult ponderea căilor RFS prezentate în fig. 4.1, vom parcurge lista în continuă creștere a fotosensibilizatorilor în a căror reacții s-au evidențiat peroxizi ca produși intermediari sau finali.

Antracenul în stare de triplet reacționează cu oxigenul observîndu-se formarea unui peroxid prin măsurători de flash-fotoliză [51]. Cinetica autooxidării și reacției de fotosensibilizare a antracenului este identică, doar că în oxidarea directă antracenul poate fi atît sensibilizator, cît și substrat [38]. Un compus înrudit, rubrenul, fotosensibilizează autooxidarea aliltioureei, dar clorofila îi poate sensibiliza oxidarea. Antracenul formează prin RFS endoperoxizi izolați destul de greu [57] din cauza tendinței de scindare a legăturii peroxi cu formare ulterioară de derivați dihidroxi. 7,12-Dimetilbenzantracenul (β) formează un fotoprodus, probabil endoperoxid, cu activitate cancerigenă mai puternică decît a dimetilbenzantracenului (α) [39]. În partea doua a cărții se va arăta că mulți compuși cu activitate cancerigenă pot acționa ca fotosensibilizatori, izolîndu-se în unele cazuri peroxizi ca intermediari.

Clorofila și porfirinele formează un grup de fotosensibilizatori intens studiat, deoarece prin RFS inițiază autooxidarea unui mare număr de substanțe cum ar fi amine, olefine, terpene, tiouree, mercaptani, aldehide, fenilhidrazină, benzidină, ergosterol, acid ascorbic, rubren și, după Livingston [38], ar putea, teoretic, să inițieze autooxidarea oricărui agent reducător. Studii de flash-fotoliză [21] au arătat că în urma absorbției luminii UV, clorofila trece într-o stare excitată, fluorescentă, care poate

Scanned with OKEN Scanner

reacţiona cu oxigenul molecular sau în stare singlet. Nu vom insista asupra reacţiilor fotochimice ale clorofilei, problemă vastă tratată în cărţile despre fotosinteză (53). Cu toate studiile întreprinse, mecanismul RFS iniţiată de clorofilă nu este încă clarificat, cum nu s-a găsit încă o explicaţie satisfăcătoare pentru randamentul cuantic mic al clorofilei în stare redusă de 0,10 [22]. După mecanismul propus de Gaffron [22] un prim produs stabil al RFS iniţiată de clorofilă ar trebui să fie un peroxid. Cu toate că un astfel de peroxid nu a fost încă izolat, RFS iniţiate de clorofilă produc peroxizi aşa cum a fost demonstrat în cazul α-terpenului [79], rubrenului [22], acidului oleic şi metil linoleatului [33].

Porfirinele, ca deuteroporfirina sau hematoporfirina, produc prin iluminare stări triplet excitate de viaţă lungă care realizează un transfer de energie cu O_2 producînd $^1O_2$ [68]. Pe această cale porfirinele sensibilizează fotooxidarea unor molecule organice cu moleculă mică (amine), dar în special aminoacizi sau acizi graşi nesaturaţi.

Toţi acizii graşi, în special cei nesaturaţi, provin din surse vegetale sau animale unde au avut mari ocazii să vină în contact cu pigmenţi naturali cum sînt clorofilele şi porfirinele, care în decursul extragerii sau manipulării au putut iniţia RFS pe calea $^1O_2$. Rawls şi Santen [54] au expus un film subţire de metil linoleat unei surse de $^1O_2$ (descărcări electrice în gaze). Conform reacţiei din fig. 4.7.A produşii prezintă o creştere a absorbţiei la 234 nm datorită formării sistemului dien conjugat. Odată ce se formează peroxizii, ei iniţiază autooxidarea acidului gras, dar şi descompunerea lor, astfel că în final apar alţi compuşi, în special cu grupare carbonil (Capitolul 2). Compararea probelor de acizi expuse doar la curent de aer au arătat că autooxidarea prin singlet decurge de cel puţin 1500 ori mai repede decît oxidarea prin O_2. Reacţia de mai sus poate fi catalizată şi prin clorofilă sau hemporfirine prin RFS, iar captatori specifici ai $^1O_2$ cum sînt caroteni sau TME (tetrafenil ciclopentadienonă) o inhibă

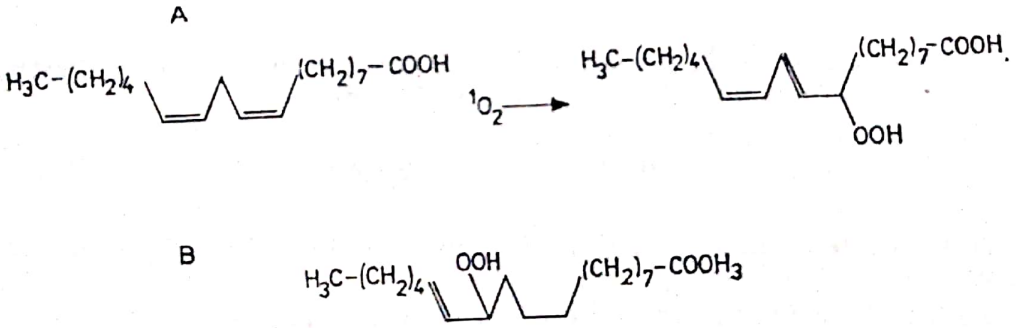


Fig. 4.7. Fotooxidarea sensibilizată a acizilor graşi nesaturaţi. A. Formarea sistemului dienconjugat; B. Hidroperoxid neconjugat al acidului linoleic format prin RFS în prezenţa clorofilei [54].

complet. Compuşii finali ai autooxidării metil linoleatului prin $^1O_2$ (descărcări în gaze) sau prin RFS iniţiate de pigmenţi naturali sînt aceiaşi aşa cum au arătat separările cromatografice în strat subţire pe silicagel. Mai mult, în urma RFS a metil linoleatului iniţiată de clorofilă s-a izolat un hidroperoxid neconjugat a cărui formulă este prezentată în fig. 4.7.B.

Pe de altă parte, autooxidarea iniţiată prin radicali liberi produce numai izomeri conjugaţi (fig. 4.7. A), aşa încît hidroperoxizii neconjugaţi

Scanned with OKEN Scanner

provin din acțiunea $^1O_2$ și sînt folosiți în demonstrarea mecanismului de reacție pe această cale.

RFS inițiate de coloranți sînt din ce în ce mai larg folosite, atît în scopuri teoretice, dar și aplicative. Așa cum s-a arătat mai înainte (fig. 4.6), în urma absorbției luminii, molecula de colorant S trece într-o stare excitată triplet din care poate iniția oxidarea unui substrat, A, prin mecanismele indicate în fig. 4.6, predominînd însă mecanismul prin $^1O_2$, conform reacțiilor (7—10) [18]. Un studiu cantitativ al RFS inițiate de coloranți este complicat de prezența unui transfer de energie triplet-triplet de la colorant la substrat [16], dimerizarea coloranților la concentrații mari [82], dependența de *p*H [61], prezența unor impurități cu acțiune inhibitoare.

Ținînd seama de valorile unor constante din reacțiile (7) și (9), $k_1 = 2 \cdot 10^9$ l·mol^{-1}·s^{-1} și k_d — aproximativ 10^4 s^{-1}, aportul $^1O_2$ în RFS este dat de reacția (11), în care I_a este constanta reacției de

$$d(^1O_2)/dt = I_a \varphi_T \tag{11}$$

absorbție a luminii de către sensibilizatorul S, iar φ_T este randamentul cuantic al RFS. Prin prezența unui substrat, A, care va reacționa cu $^1O_2$, vor trebui luate în considerare reacțiile (12) și (13)

$$^1O_2 + A \xrightarrow{k_r} AO_2 \text{ (produs)} \tag{12}$$

$$- d(^1O_2)/dt = (k_d + k_r[A])[^1O_2] \tag{13}$$

Va rezulta că prin RFS, consumul substratului A va fi dat de relația

$$- d[A]/dt = k_r[A][^1O_2] = I_a \varphi_T K_r[A]/(k_d + k_r[A]) \tag{14}$$

(14) folosită în reacții de fotosensibilizare și fotooxigenare [5]. Pentru concentrații foarte mici de substrat ecuația (14) devine:

$$- d[A]/dt = I_a \varphi_T k_r[A]/k_d \tag{15}$$

observîndu-se o dependență liniară a vitezei de oxigenare în funcție de concentrația substratului.

Implicarea $^1O_2$ în fotooxidările rezultate prin RFS inițiate de coloranți a fost demonstrată pentru o gamă largă de compuși cum sînt amine [84], 1,2-diamino, 4,5-hexametilbenzen [30], N,N-dimetilaniline [58], aminoacizi [29], proteine [29], colagen, acizi grași [76].

Rizzuto și Spikes [58] au studiat contribuția diferitelor căi în fotooxidarea tripsinei sensibilizată cu eozină și au găsit că reacția dintre eozină (triplet) și O_2 decurge de 18 ori mai eficient decît reacția dintre eozină (triplet) și tripsină. Rezultatele lor confirmă ponderea majoră a mecanismului „*D—O*" în RFS inițiată de eozină. Nilsson și Kearns [47] au confirmat aceste date pentru fotosensibilizarea inițiată de albastru de metilen a tripsinei folosind D_2O ca solvent pentru a crește randamentul producerii $^1O_2$. În reacția de fotosensibilizare inițiată de eozină s-a mai constatat o

Scanned with OKEN Scanner

valoare mare pentru constanta k_{11} (fig. 4.6) = 8,4 $\times 10^8$ $M^{-1} \cdot s^{-1}$ sugerînd formarea eozinei semioxidate și implicarea ei într-o reacție de fotoinactivare.

Eficiența formării $^1O_2$ în RFS inițiate de coloranți depinde și de natura acestora. Flavinele fotoexcitate [6] și coloranții trifenilmetanici [23] nu produc $^1O_2$ într-o măsură apreciabilă. Flavinele în stare excitată singlet reacționează cu apa sau alcoolul formînd hidroxiflavine. Cristal violetul în stare triplet extrage un atom de hidrogen din gruparea SH a cisteinei formînd un radical tiil, care apoi reacționează cu O_2 cu producere de acid cisteic și H_2O_2. Randamentul cuantic al producerii $^1O_2$ de către un fotosensibilizator poate fi evaluat folosind un sistem 2,5-dimetilfuran/albastru de metilen ca standard [75]; cicloadiția-1,4 la dienele conjugate se produce cu o eficiență de 100% și φ^1O_2 pentru albastru de metilen este de 0,52. Din păcate, nu s-au publicat suficiente lucrări asupra determinării comparative a randamentelor cuantice pentru producerea $^1O_2$. Saito și colaboratorii [59] au observat o cicloadiție-1,2 a $^1O_2$ la ciclul benzenic în RFS inițiată de roz bengal; anilinele *o*-substituite prin scindare 1,2 produc un intermediar cu structură benzen dioxietan, conform mecanismului din fig. 4.5.C.

După cum s-a arătat în fig. 4.6, în RFS la mecanismele „*D—O*" și „*D—R*" era postulată apariția unei alte forme de oxigen activ, superoxid $O_2^{\cdot-}$, în urma reacției unor radicali ai fotosensibilizatorului cu oxigenul. Balmy și Douzou [5] au studiat RFS inițiate de fluoresceină și pentru detectarea $O_2^{\cdot-}$ au folosit o metodă originală constînd din lactoperoxidază și luminol (substanță redox utilizată în chemiluminiscență). Peroxidaza formează un complex cu $O_2^{\cdot-}$ format activînd de 100 ori emisia de lumină declanșată de excitarea luminolului. Secvența reacțiilor este următoarea:

$$\text{Fluoresceină (triplet)} + O_2 \rightarrow \text{Fluoresceină} + {}^1O_2 \text{ sau } O_2^{\cdot-}$$

$$\text{Peroxidaza-}Fe^{3+} + O_2^{\cdot-} \rightarrow \text{Complex III } (Fe^{3+} \ldots O_2^{\cdot-})$$

$$\text{Complex III} + \text{Luminol—}H_2 \rightarrow \text{Peroxidază—}Fe^{3+} + \text{Lum—}H^{\cdot} + HOO^-$$

Adăugînd mediului de reacție superoxid dismutază, enzimă care distruge $O_2^{\cdot-}$ specific, se poate inhiba RFS inițiată de fluoresceină.

Dacă implicarea formelor active ale oxigenului, în special a singletului, este aproape unanim acceptată în RFS inițiate de coloranți, formarea hidroperoxizilor ca produși intermediari este încă în studiu. Formarea lor este de așteptat ca urmare a acțiunii oxidante a formelor active ale oxigenului, în special $^1O_2$ și evidențierea lor dificilă este de asemenea o consecință a reactivității lor și a apariției unor produși finali cu structuri diferite (carbonili, acizi carboxilici). Cu toate dificultățile existente au fost identificați hidroperoxizi în RFS inițiate de albastru de metilen la olefine [17], indoli 2,3-disubstituiți [41], acizi grași [76].

Terao și Matsushita [76] au publicat un studiu detaliat asupra formării hidroperoxizilor ca produși finali ai RFS a esterilor acizilor grași nesaturați inițiată de albastru de metilen. Ei au găsit că în urma RFS oleatul formează hidroperoxizi izomeri 9—, 10—, linoleatul 9—, 10—, 12— și 13—, iar linolenatul 9—, 10—, 12—, 13—, 15 — și 16—. Aceiași izomeri s-au obținut și prin fotooxidarea acestor acizi inițiată de clorofilă [40].

Distribuţia izomerilor diferă în autooxidarea termică a acizilor graşi nesaturaţi. Poziţia grupării peroxi în oxidarea fotosensibilizantă este legată de atomul de carbon situat la capetele dublei legături. În consecinţă, numărul izomerilor produşi este dublu faţă de cel al dublelor legături din fiecare ester acid gras. Măsurătorile absorbţiei în infraroşu au indicat deplasări ale dublelor legături determinînd o configuraţie *trans*. În schimb $^1O_2$ acţionînd după un mecanism de tip „enă" (fig. 4.5.c) se situează în *cis* faţă de hidrogenul ce va fi transferat. S-a constatat, dealtfel, o preferinţă pentru formarea izomerilor conjugaţi pentru acizii graşi conţinînd sistemul 1,4-dien. Acelaşi mecanism acţionează asupra RFS a trigliceridelor, fiecare parte acid gras din triglicerid reacţionînd separat.

O ultimă problemă legată de RFS este cea a inhibitorilor care acţionează prin „stingerea" (*quench*) stării excitate a sensibilizatorilor. Astfel, colorantul în stare triplet ^3S va reacţiona cu substratul A producînd radicalul semiredus al colorantului, R·, şi radicalul semioxidat al substratului ($A_{ox}^{\cdot}$), dar ^3S poate fi deactivat şi să permită trecerea colorantului în stare fundamentală S:

$$S^3 + A \begin{cases} \nearrow R\cdot + A_{ox}^{\cdot} \\ \searrow S + A \end{cases}$$ constanta de viteză k_q

Dar şi oxigenul poate „stinge" starea triplet a colorantului cu sau fără formarea oxigenului în stare singlet $^1O_2$:

$$S^3 + O_2 \begin{cases} \nearrow S + {}^1O_2 \\ \searrow S + {}^3O_2 \end{cases}$$ constanta de viteză k_q'

Ţinînd seama de reacţia de stingere a ^3S datorită unor impurităţi (în absenţa substratului şi a oxigenului) cu o constantă de viteză k_0, constanta globală a „stingerii" stării triplet a colorantului va fi:

$$k = k_0 + k_q'[O_2] + k_q\,[A]$$

Pentru o concentraţie constantă de oxigen, relaţia de mai sus devine

$$k_q = (k - k_0)/[A] \qquad (16)$$

Cunoscînd valorile constantelor de „stingere" ale fotosensibilizatorului de către substrat şi de către oxigen se poate aprecia ponderea mecanismelor implicate în RFS (fig. 4.6). Desfăşurarea unei reacţii de „stingere" tipică este prezentată în fig. 4.8.

Lista substanţelor capabile să „stingă" o RFS este destul de mare şi o discuţie despre acest fel de inhibitori ar depăşi cadrul expunerii [73, 78]. Acceptorii $^1O_2$ pot „stinge" o RFS şi prin acest efect se poate demonstra ponderea mecanismului oxidativ „*D—O*". Astfel de substanţe sînt: aliltiouree, histidină, imidazol, triptofan, acid 3-indolacetic, citidină, guanozină, metionină şi unele enzime cum ar fi tripsina. Cei mai eficienţi

Scanned with OKEN Scanner

acceptori sînt aminoacizii, avînd valori ale constantei k_q între 10^8—10^9 $M^{-1} \cdot s^{-1}$ [37]. Pentru fiecare inhibitor există un domeniu optim de activitate, de obicei între 10^{-5}—10^{-3} M. La concentraţii mai mici, inhibitorii nu pot acţiona competitiv în „stingerea" $^1O_2$, iar la concentraţii mai mari predomină reacţii secundare cu substratul sau cu fotosensibilizatorul din mediul

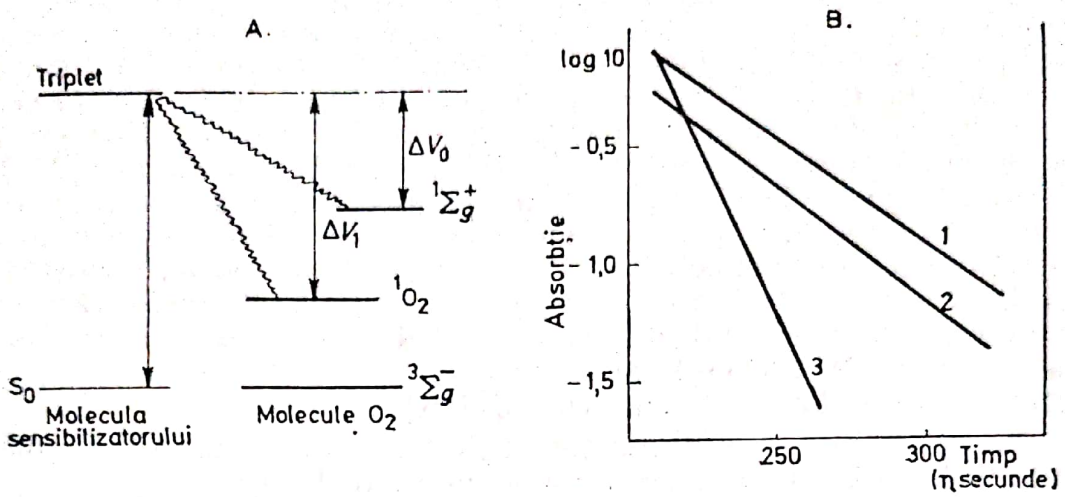


Fig. 4.8. A. Reprezentarea schematică a Stingerii (Quench) a stării de excitaţie triplet a unui fotosensibilizator de către $O_2^{-\cdot}$(— — — transfer electronic de energie către O_2, ——— conversia stării triplet remanente către starea fundamentală S_0). ($^1\Delta_g$ şi $^1O_2$ = singlet ai O_2). B. „Stingerea" la 775 nm a unei soluţii de tionină ($5 \cdot 10^{-6}$ M) excitată cu laser, în absenţa substratului (1), în prezenţa *p*-nitrosodimetilanilinei ($2 \cdot 10^{-4}$ M) (2) şi azidei de sodiu ($2 \cdot 10^{-2}$ M) (3) [37].

de reacţie. Ionul azidă (N_3^-) este un inhibitor eficient atît al $^1O_2$, cît şi al fotosensibilizatorilor în stare triplet. *p*-Nitrozodimetilanilina este un inhibitor eficient al RFS acţionînd specific asupra radicalilor sensibilizatorilor.

Eficienţa unui inhibitor depinde foarte mult de natura fotosensibilizatorului folosit. De exemplu, ionul I^- nu acţionează asupra sistemului eozină-tripsină, în schimb este foarte eficient inhibitor în RFS ale flavinelor în sistem cu tripsină.

Cu toate că azida inhibă RFS în sistemul albastru de metilen-olefine s-au izolat α-azido-hidroperoxizi în loc de α-hidroperoxizi obţinuţi în absenţa azidei [17]. Aceşti hidroperoxizi apar nu prin intermediul $^1O_2$ ci printr-un transfer iniţial de electroni de la N_3^- la ^3S formînd radicali azidă. Aceştia la rîndul lor vor reacţiona cu O_2 pentru a da α-azido-hidroperoxizi. Acest mecanism a fost confirmat şi de Nilsson [45], care a găsit că oxigenul este de 10^4 ori mai eficient decît azida în „stingerea" stării triplet. Aminele aromatice şi β-carotenul sînt inhibitori mai puternici ai RFS acţionînd asupra ambelor mecanisme principale („*D*—*O*" şi „*D*—*R*") [11]. β-carotenul acţionînd la concentraţii sub 10^{-3} M joacă un rol foarte important în medierea reacţiilor de transfer de energie ce au loc în cursul fotosintezei [19, 71]. Rolul biologic al porfirinelor şi carotenului va fi discutat în Capitolul 8.

Scanned with OKEN Scanner

4.3. CHEMILUMINISCENȚĂ

După cum îi arată numele, chemiluminiscența (CL) este un proces fizico-chimic, în care în urma unei reacții chimice exergonice, energia este eliberată sub formă de lumină, de cele mai multe ori invizibilă cu ochiul liber. Pe lîngă acest proces, și strîns legat este și fotochemiluminiscența (FCL), în care lumina este emisă în urma unei reacții chimice inițiată de lumină (vizibil, UV) sau radiații ionizante. Asocierea CL cu procese în care se eliberează radicali liberi intermediari cu conținut bogat energetic se impune de la început, deși această condiție nu este suficientă. Într-adevăr toate procesele în care se produc radicali liberi se întovărășesc de o CL, iar pe de altă parte CL este inhibată în atmosferă de azot. Deși nu există o teorie a CL unanim admisă, la bază se găsește reacția radicalilor liberi degajați din reacția chimică inițială cu oxigenul molecular, rezultînd o activare a acestuia. Nici instrumentele de măsură nu sînt standardizate, existînd o mare varietate de dispozitive avînd la bază un tub fotomultiplicator, de tip RCA 6655 A sau asemănător sau contoare de scintilație ori fluorometre cu lampa de emisie oprită [48].

În cazul CL, o primă reacție implică formarea radicalilor liberi, cum ar fi descompunerea unui peroxid (mai ales H_2O_2):

$$ROOH \rightarrow R^{\cdot} + O_2^{-} + H^{\cdot}(OH^{\cdot}) \qquad (17)$$

Acești radicali reacționează cu o altă substanță AH sau HA^{-} producînd

$$AH \xrightarrow[O_2]{O_2^{-},\ OH^{\cdot}} A^{\cdot} \rightarrow A \quad \text{sau} \quad X + h\nu \qquad (18)$$

CL și transformarea substanței A în X ori revenirea la starea inițială A. În locul descompunerii peroxidului poate fi și altă reacție, cum ar fi o scindare homolitică așa cum se întîmplă în autooxidări.

În cazul FCL, o substanță S suferă o fotoliză sau o radioliză

$$S \overset{\omega}{\rightsquigarrow} R^{\cdot} \text{ sau } R' + R'' \qquad (19)$$

Viteza fotolizei ω depinde de concentrația inițială a substanței, c_0 și de intensitatea radiației utilizate I_r. În cazul soluțiilor saturate în aer, ($[O_2] = 7 \cdot 10^{-3}$ moli/l) se formează radicali peroxi cu o eficiență

$$R^{\cdot} + O_2 \rightarrow ROO^{\cdot} \qquad (20)$$

$\varphi_r = 3 \cdot 10^{-2}$ radicali/UV foton [64]. Acești radicali se transformă în radicali secundari sau suferă o reacție de dismutare ce duce la formarea unor produse în stări electronice excitate singlet sau triplet de tip $n - \pi$ sau $\pi - \pi^*$. Aceste stări excitate $P^{\cdot}$ emit un foton (21) sau pot să transfere energia unei alte molecule A (22)

$$P^{\cdot} \rightarrow P + h\nu \qquad (21)$$

$$P^{\cdot} + A \rightarrow P + A^{\cdot} \qquad (22)$$

Scanned with OKEN Scanner

Eficiența procesului de chemiluminiscență φ_{CL} poate fi definită ca

$$\varphi_{CL} = \frac{\text{numărul (sau viteza) fotonilor emiși}}{\text{numărul (sau viteza) moleculelor ce reacționează}}$$

sau ca intensitatea procesului I_{CL} conform expresiei:

$$I_{CL} = I_r \varphi_r \varphi_{CL} \tag{23}$$

în care I_r este intensitatea radiației ce inițiază reacția (pentru FCL).

Multe procese oxidative sînt însoțite de o CL de mică intensitate (10^3 — 10^8 cuante $\cdot cm^{-3} \cdot s^{-1}$). Emisia de lumină este strîns legată de activarea oxigenului, după toate probabilitățile sub formă de superoxid, O_2^- măsurat printr-un sistem „*stopped flow*" cu ajutorul rezonanței electronice de spin [44]. Durata unui *flash* coincide cu cinetica formării O_2^-. Implicarea directă a superoxidului în CL dezvoltată în unele reacții a mai fost dovedită în sistemul H_2O_2-periodat [34], xantină-xantin oxidază [36], descompunerea 1-fosfat-2,8,9-trioxiadamantan ozonidei [25], autooxidarea citocromului P—450 din microzomii hepatici [66], fagocitoza din leucocitele macrofage [80]. Inhibarea Cl din aceste reacții de către superoxid dismutază constituie o dovadă suplimentară și puternică în susținerea rolului O_2^- în acest fenomen.

Nu este exclus și datele recente susțin de asemenea implicarea oxigenului sub formă de singlet rezultat fie în cursul procesului autooxidativ asociat, fie în urma reacției de dismutare a superoxidului

$$2\,O_2 + 2\,H^+ \rightarrow {}^1O_2 + H_2O_2 \tag{24}$$

$$2\,{}^1O_2 \rightarrow 2\,O_2 + h\nu \tag{25}$$

În sprijinul implicării ambelor forme active ale oxigenului în CL există atît efectul inhibitor al superoxid dismutazei [24], cît și apariția CL în procese autooxidative sau peroxidative. Asocierea CL cu propagarea peroxidării a fost observată în cazul hidrocarburilor [56], analogilor acidului piruvic ai hormonilor tiroidieni [13], peroxidării lipidelor microzomiale [70], fagocitozei din leucocitele macrofage [80], în care apar ambele forme active ale oxigenului, dar și o peroxidare a lipidelor.

Recent, Slawson și Adamson [65] au găsit un randament cuantic de $5 \cdot 10^{-12}$ pentru CL emisă în cursul autooxidării acidului linoleic pe silicagel, valoare de același ordin cu cele observate în autooxidări omogene. Maximul CL de la 530 nm corespunde radicalilor peroxi asociat cu o emisie datorită unei stări excitate cetonă. Al doilea maxim de la 630 nm se atribuie $^1O_2$ [35], datorită unei reacții bimoleculare.

După cum reiese din relația (24), în urma reacției de dismutare a O_2^- se produce și peroxid de hidrogen, H_2O_2. Or în majoritatea reacțiilor în care este implicat acest compus s-a observat o CL de mică intensitate dar de lungă durată. Astfel CL a fost observată în reacțiile H_2O_2 cu extrase de ficat, [9], acizi nucleici, proteine, aminoacizi [72], riboflavină,

Scanned with OKEN Scanner

polifenoli, taninuri [62], luminol [44], hipoclorit de sodiu [42], substanţe organice iradiate [64].

Una din cele mai interesante reacţii de producere a CL este cea dintre hemoproteine (hemoglobină, citocromi) cu H_2O_2, ce produce un *flash* de lumină ce durează aproximativ 10 secunde urmată de o emisie CL de mică intensitate şi de lungă durată (fig. 4.9 A). Intensitatea CL

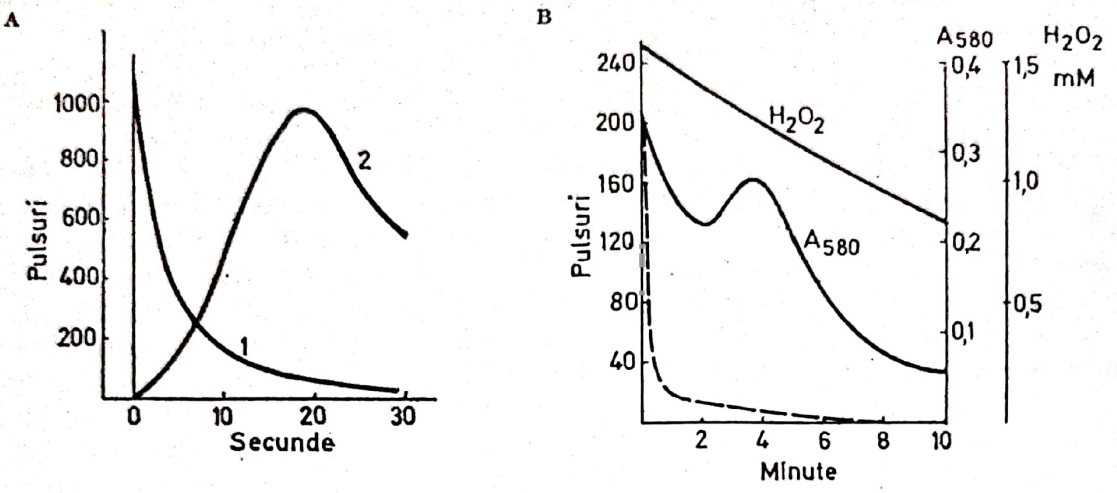


Fig. 4.9. A. Chemiluminiscenţă rezultată în urma reacţiei citocromului c ($1 \cdot 10^{-6}$M) sau a suspensiei de hemină (10^{-4} M) cu H_2O_2 (10^{-3} M) la *p*H 9. B. Variaţia chemiluminiscenţei (— ——), absorbţiei la 580 nm datorită ciclului porfirinic şi a concentraţiei H_2O_2 în timpul reacţiei dintre hematină şi H_2O_2 [63].

creşte odată cu *p*H-ul, fiind maximă la *p*H = 12, valoare egală cu constanta de disociere a $H_2O_2 = 2{,}5 \cdot 10^{-12}$. Energia de activare a acestei reacţii este de 22,8 kJ/mol^{-1}, valoare mai mare decît reacţiile tipice radicalilor. Absorbţiile la 400, 515 şi 580 nm sînt caracteristice ciclului porfirinic al hemoproteinelor. În fig. 4.9. B se observă că în urma reacţiei cu H_2O_2 se produce o CL legată de absorbţia de la 580 nm (deschiderea ciclului hem) şi de concentraţia peroxidului de hidrogen [64]. O relaţie asemănătoare s-a găsit şi între dezvoltarea CL şi scăderea maximului de la 406 nm, caracteristic hemoproteinelor. După Slawinski [63] pentru primul flash de CL al acestei reacţii s-a calculat o constantă de viteză $k_1 = 1{,}8 \cdot 10^{-2}$ în timp ce pentru partea a doua a curbei de CL (fig. 4.9.A şi B) $k_2 = 3.\ 10^{-2}\ s^{-1}$. După Slawinski [64] în această reacţie coexistă două mecanisme; unul în care se formează oxigen activ sub formă de $^1O_2$ în urma descompunerii H_2O_2 catalizată de gruparea hem a hemoproteinelor:

$$H_2O_2 \xrightarrow{\text{hem}} OH^{\cdot},\ OOH^{\cdot},\ O_2^{-}$$

$$OH^{\cdot} + OOH^{\cdot} \rightarrow H_2O + {}^1O_2$$

$$OOH^{\cdot} + OOH^{\cdot} \rightarrow H_2O_2 + {}^1O_2$$

Al doilea mecanism implică distrugerea oxidativă a hemului de către formele active ale O_2, un atac nucleofilic asupra punţii metilen a hemului cu densitate electronică mare. O astfel de distrugere observabilă spectrofotometric (absorbţiile de la 406 şi 580 nm) eliberează o energie de 70 kcal/mol suficientă pentru emisia de CL.

Scanned with OKEN Scanner

Olinescu şi colaboratorii [48, 49] au modificat reacţia dintre H_2O_2 şi hemoproteine în sensul unui sistem format dintr-o hemoproteină (mai ales hemoglobină) şi un solvent organic, dioxanul. Reacţia ce duce la modificări asemănătoare ale spectrului hemoglobinei sau citocromului c este întovărăşită de o CL de mai mare intensitate, funcţie de concentraţia hemoglobinei din amestecul de reacţie (fig. 4.10 A). Acest sistem poate activa CL oricăror proteine purificate (fig. 4.10 B) sau a unui amestec

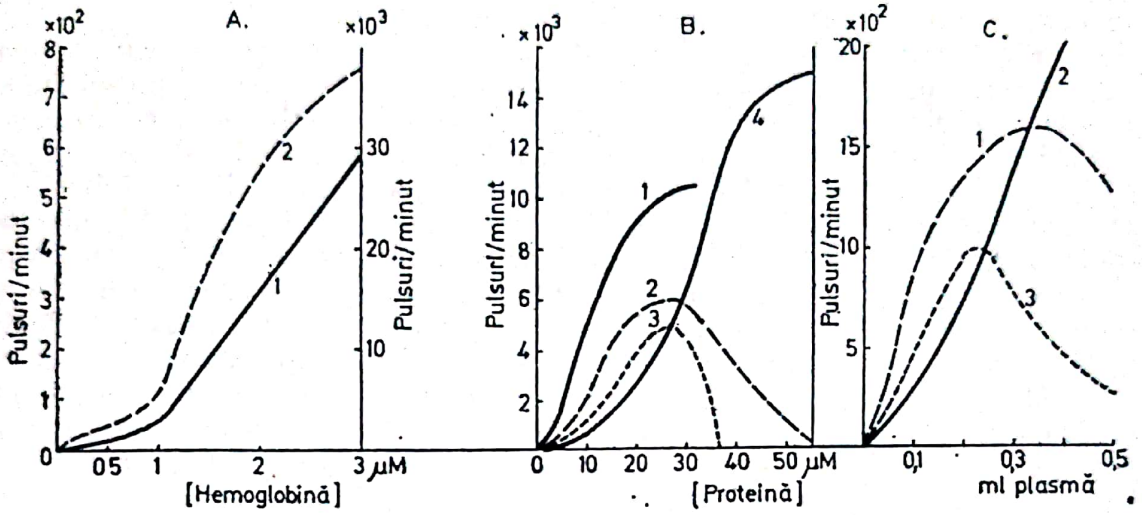


Fig. 4.10. Chemiluminiscenţă produsă în sistemul hemoglobină-dioxan [49]. A. Chemiluminiscenţă în funcţie de concentraţia hemoglobinei: (1) hemoglobină (ordonata dreapta) şi albumină (20 µM) (stînga); B. Efectul prezenţei unor proteine: (1) insulina, (2) albumina, (3) D-aminoacid oxidaza, (4) deoxiribonucleaza. C. Efectul prezenţei serului de (1) cîine, (2) porc, (3) om.

complex de proteine aşa cum este plasma sanguină de la orice specie de animal (fig. 4.10 c). Această ultimă reacţie cu producere de CL poate oferi o nouă metodă de diagnostic, deoarece CL astfel indusă variază pentru acelaşi animal, în funcţie de starea fiziologică.

Oricum, CL îşi găseşte aplicaţii analitice clinice [81], histochimice [14], toxicologice [67], farmacologice ([20, 21].

4.4. ACŢIUNEA RADIAŢIILOR IONIZANTE

Radiaţiile ionizante de orice tip constituie o formă de energie ce va acţiona asupra materiei inerte sau vie. Absorbţia acestei energii de către materie constituie prima acţiune a radiaţiilor ionizante (RI). Desigur, va fi prezentat numai rolul peroxidării sau autooxidării induse de acţiunea RI, cu atît mai mult cu cît bazele acestei acţiuni au fost fundamentate în anii 1950—60 mai ales de către Bacq şi Alexander [4].

În acţiunea RI se deosebeşte un mecanism *direct* ce produce ionizarea şi excitarea moleculelor afectate şi unul *indirect* ce apare în soluţii diluate implicînd interacţia cu solventul, respectiv apa. În ambele cazuri, mecanismele propuse admit formarea radicalilor liberi în urma absorbţiei particulelor iniţiale (electroni de mare energie).

Scanned with OKEN Scanner

În cazul apei deaerate se va produce o radioliză cu formarea secundară a altor radicali prezentaţi schematic în ecuaţia (26)

$$H_2O \rightsquigarrow (H_2O^+, e^-) \xrightarrow{H_2O} H_3O^+, H^\cdot, HO^\cdot, e^-_{aq}, H_2O_2, H_2 \qquad (26)$$

Hidrogenul atomic $H^\cdot$, radicalul hidroxil $OH^\cdot$, electronul solvatat e^-_{aq} şi peroxidul de hidrogen H_2O_2 vor deteriora la rîndul lor substanţe organice, polimeri şi biopolimeri întîlnite pe parcurs.

Electronul iniţial aparţinînd RI parcurge mediul depozitînd energia intermitent formînd molecule excitate şi ionizate de-a lungul parcursului a cărui lungime depinde de energia particulei iniţiale. Pentru radiaţii γ Co^{60} parcursul mediu este de cîţiva milimetri şi transferul de energie se face în 10^{-9} secunde. Moleculele organice produc radicali liberi de tipul $H^\cdot$, $R^\cdot$, R^+ şi R^- (radical organic cationic şi anionic). În 10^{-6} secunde de la iradiere, în medii biologice, produşii rezultaţi din radioliza apei vor reacţiona cu molecule sau radicali organici producînd radicali liberi sau molecule organice deteriorate. Pentru o iradiere de 1000 rads în soluţii apoase diluate se obţin aproximativ $6 \cdot 10^{-6}$ moli/litru [3,4, 28].

Majoritatea energiei absorbite de materie se pierde sub formă de căldură şi aproximativ 25% apare sub formă de modificări chimice. S-a calculat că 4 eV (sau 4×23 kcal/mol) sînt necesari pentru a rupe o legătură organică puternică. Reactivitatea radicalilor liberi variază foarte mult, mergînd de la specii instabile la molecule complexe, stabile, cu reactivitate mică. Instabilitatea radicalilor liberi este mult modificată de impedimente sterice. Astfel cărbunele, turba şi gudroanele din petrol conţin cca. 10^{19} radicali/gram, o cantitate egală poate fi obţinută prin iradierea unor substanţe organice cu o doză de 10^9 rads. În mediu apos viaţa medie a radicalilor liberi este de aproximativ 10^{-6} secunde datorită reacţiilor în care sînt implicaţi, şi de aceea randamentul (G) al multor reacţii radiochimice scade cu cît creşte parcursul particulelor.

Oxigenul are un rol extrem de important în evaluarea efectelor iradierii, prin apariţia altor reacţii producătoare de radicali liberi.

$$H_2O + O_2 \longrightarrow OH^\cdot + O_2H^\cdot$$

$$H^\cdot + O_2 \longrightarrow O_2H^\cdot \qquad R^\cdot + O_2 \longrightarrow RO_2^\cdot \qquad (27)$$

Apariţia radicalilor peroxi $ROO^\cdot$ măreşte mult nocivitatea iradierii. În timp ce prin combinarea unor radicali liberi primari ce reacţionează între ei se produc compuşi stabili de forma :

$$R^\cdot + R^\cdot \rightarrow R - R \qquad (28)$$

radicalii peroxi se descompun formînd alţi radicali $R^\cdot$, continuînd propagarea reacţiilor în lanţ. În plus, prin capturarea unui H^+ se produc hidroperoxizi, ROOH, care mai păstrează proprietăţile radicalilor liberi în sensul instabilităţii şi marii reactivităţi.

$$O_2H^\cdot + e^- \rightarrow HO_2^-. \qquad (29)$$

Scanned with OKEN Scanner

De asemenea în soluţii aerate mai apare radicalul HO_2^-, cu un potenţial redox de 1,5 V, dar mai stabil, permiţînd reacţii la distanţă mare. Reducerea sa produce peroxid de hidrogen, H_2O_2, ce poate oxida doi echivalenţi oxidanţi. Formarea H_2O_2 în urma acţiunii RI a fost observată de foarte mult timp, mai ales după iradieri cu radiaţii α, ce produc multe ionizări. După Allen [1], concentraţia H_2O_2 ar trebui să fie proporţională cu rădăcina patrată a intensităţii radiaţiei. Dar acest peroxid este implicat în multe reacţii de felul:

$$H_2O_2 + H^\cdot \rightarrow OH^\cdot + H_2O \qquad H_2O_2 + OH^\cdot \rightarrow HO^\cdot + H_2O \qquad (30)$$

dar şi $HO_2 + H^\cdot \rightarrow H_2O_2$ sau $OH^\cdot + OH^\cdot \rightarrow H_2O_2$

De îndată ce o substanţă ce poate reacţiona cu radicalii $H^\cdot$ şi $OH^\cdot$ se găseşte prezentă într-o soluţie supusă iradierii, va apare o cantitate mare de specii reactive derivate. Concentraţia H_2O_2 va creşte cu doza iradierii pînă ce se stabileşte un echilibru la doze la care concentraţia H_2O_2 formată devine egală cu cea a substanţei dizolvate, astfel că apare o competiţie pentru combinare cu radicali liberi (fig. 4.11).

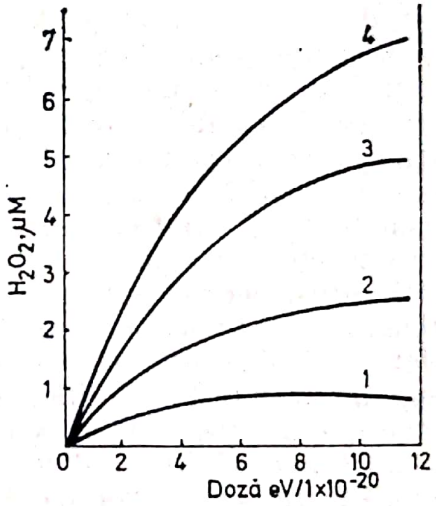


Fig. 4.11. Efectul creşterii concentraţiei substanţei dizolvate asupra H_2O_2 produsă prin radioliza apei deaerate. (1) în absenţa şi în prezenţa acrilamidei (2) $5 \cdot 10^{-5}$ *M*, (3) $5 \cdot 10^{-4}$ M şi (4) $1 \cdot 10^{-3}$ M.

Un prim efect al iradierii substanţelor organice în soluţie va fi creşterea autooxidării. Aceasta începe, ca şi în alte cazuri (Capitolele 2—4), prin pierderea unui atom de hidrogen:

$$R - CH_3 + OH^\cdot \rightarrow R - CH_2^\cdot + H_2O \qquad (31)$$

Aproape simultan vor apare radicali peroxi, în reacţii asemănătoare cu

$$R - CH_2^\cdot + O_2 \rightarrow R - CH_2OO^\cdot \qquad (32)$$

cele din (27), care se vor propaga cu formare de hidroperoxizi şi alţi

$$R - CH_2OO^\cdot + R - CH_3 \rightarrow R - CH_2^\cdot + R - CH_2OOH \qquad (33)$$

radicali liberi. La presiunea atmosferică obişnuită, concentraţia O_2 în solvenţi organici este de aproximativ 10^{-3}M, ceea ce determină ponderea mare a vitezei reacţiei (33) şi a concentraţiei radicalilor $ROO^\cdot$ peroxi faţă de $R^\cdot$, permiţînd stabilirea unor reacţii în lanţ.

Scanned with OKEN Scanner

Acizii graşi polinesaturaţi din alimente sau membranele celulare sau intracelulare constituie substratul cel mai favorabil autooxidării indusă de iradiere. Se produc hidroperoxizi proporţionali cu concentraţia acidului gras iniţial şi în funcţie de presiunea O_2 [28, 42]. De asemenea viteza formării hidroperoxizilor este direct proporţională cu doza de iradiere şi invers proporţională cu debitul dozei.

Ca şi în cazul autooxidării lipidelor produsă termic (Capitolul 2) şi cea indusă prin iradiere, aceasta determină formarea altor legături carbon-carbon şi creşterea ramificărilor intercatenare (*cross-links*). Creşterea ramificărilor produsă de iradiere se observă atît în lipide complexe, dar şi în polimeri, proteine, acizi nucleici, alimente sau membrane celulare şi modifică viteza de difuzie a O_2 sau a ionilor alterînd metabolismul celular. Difuzia neomogenă a O_2 va crea] mari diferenţe în peroxidarea acizilor graşi sau altor substanţe în polimeri solizi ori în stare de gel. Din această cauză, la suprafaţa acestora cantitatea de peroxizi este mare, iar procesul de autooxidare continuă şi după iradiere spre interior cu viteză încetinită pînă cînd polimerizarea depăşeşte ca întindere peroxidarea. Extinderea autooxidării lipidelor, uleiurilor în urma iradierii depinde de un complex de factori legaţi de iradiere (natura radiaţiilor, doza şi debitul iradierii) şi de substrat (starea fizică, natura şi concentraţia acizilor graşi, prezenţa unor prooxidanţi sau antioxidanţi). Păstrarea unor alimente pe bază de carne sau grăsimi după iradiere la temperaturi de —20°C reduce cantitatea de peroxizi. Iradierea cărnii de porc grase cu $4 \cdot 10^6$ R radiaţii gamma creşte cantitatea de peroxizi pînă la 77 meq/kg (50). Implicaţiile utilizării iradierii unor produse alimentare sau polimeri vor fi prezentate în capitolul 6.

După cum s-a arătat în capitolul 3, peroxizii formaţi în cursul autooxidării induse termic sau fotochimic (4.1) se descompun în compuşi conţinînd mai ales gruparea carbonil. Iradierea hidrocarburilor şi amestecurilor complexe de lipide produce de asemenea carbonili (aldehide, cetone, acizi) sau epoxizi asemănători dificil de analizat [12, 52]. Concentraţia compuşilor carbonil creşte cu doza iradierii şi în prezenţa unor ioni metalici (Fe^{2+}, Co^{2+}). Dealtfel iradierea unor polimeri urmată de expunerea lor la radiaţii ultraviolete produce un efect aditiv asupra formării peroxizilor şi ramificărilor [77].

Iradierea sistemelor biologice sau a organismelor vii constituie un alt aspect al interacţiei RI cu materia şi al formării peroxizilor. Deşi au la bază aceleaşi mecanisme, iradierea organismelor şi peroxidarea unor substanţe vitale celulei produc consecinţe mult diferite de cele observate în sisteme nebiologice. Asupra formării peroxizilor în cursul iradierii organismelor vii vom reveni în capitolul 11.

BIBLIOGRAFIE

1. O. A. ALLEN, *J. Phys. Colloid Chem.*, **52**, 479 (1948).
2. G. ALMSTROM, *Acta Chem. Scand.*, **19**, 300 (1965).
3. L. AUGENSTEIN, R. MASON, „Physical Processes in Radiation Biology", Academic Press, New York 1964.
4. Z. M. BACQ, P. ALEXANDER, „Fundamentals of Radiobiology", Pergamon, Oxford vol. 5 (1966).

Scanned with OKEN Scanner

5. C. BALMY, P. DOUZOU, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **56**, 386 (1974).
6. P. D. BARTLETT, G. D. MENDENHALL, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 210 (1970).
7. L. BATEMAN, G. GEE, *Proc. Roy. Soc. A*, **195**, 376, 391 (1948).
8. L. BATEMAN, G. GEE, A. MORRIS, *Discuss. Faraday Soc.*, **10**, 250 (1951).
9. M. L. BOSZORMENGYI, P. FALLOT, *Int. J. Rad. Appl. Isotop.*, **25**, 241 (1974).
10. E. J. BOWEN, D. TANNER, *Trans. Faraday Soc.*, **51**, 475 (1955).
11. D. CABERN, J. HOBBS, R. A. LUCAS, *J. Chem. Soc.*, 1897 (1966).
12. J. R. CHIPAULT, O. S. PRIVETT, *Ind. Eng. Chem.*, **49** 1713 (1957).
13. M. G. CILENTO, M. NAKANO, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **58**, 296 (1974).
14. M. J. CORMIER, D. M. HERCULES, „Chemiluminiscence and Bioluminiscence", Plenum Press, New York, cap. 1—2 1973.
15. W. G. DAUBEN, L. SALEM, N. J. TURRO, *Acc. Chem. Res.*, **8**, 41 (1975).
16. R. S. DAVIDSON, K. R. TREATHWAY, *J. Chem. Soc. Perkin*, **11**, 173, 169 (1977).
17. W. FENICAL, D. R. KEARNS, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 7771 (1969).
18. C. S. FOOTE, *Science*, **162**, 963 (1968).
19. C. S. FOOTE in „Free Radicals in Biological Systems", edit. W.A. Pryor, Academic Press, New York p. 85 1976.
20. J. L. FOX, *Chem. Eng. News*, **55**, 34 (1978).
21. E. FUJIMORI, R. LIVINGSTON, *Nature*, **180**, 1036 (1957).
22. H. GAFFRON, *Z. Physik. Chem.*, **B37**, 437 (1937).
23. G. GENNARI, G. GUZZO, G. JORI, *Photochem. Photobiol.*, **20**, 497 (1974).
24. E. P. GIBSON, *J. Forensic Sci.*, **22**, 680 (1977).
25. K. GODA, T. KIMURA, P. SCHOOP, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **58**, 660 (1974).
26. K. GOLLNICK, T. FRANCKEN, *Photobiol. Res. Sci.*, **1**, 89 (1977).
27. E. HART, M. MATHESON, *J. Am. Chem. Soc.*, **70**, 784 (1948).
28. M. HASSINSKI in „Radiation Chemistry of Aqueous Solutions" edit. R. Stein, Interscience, New York, cap. 3, 1968.
29. Y. IAMADA, B. HASSEL, *Biochim. Biophys. Acta*, **532**, 161 (1978).
30. G. JORI, *Photochem. Photobiol.*, **21**, 463 (1975).
31. D. R. KEARNS, *J. Chem. Phys.*, **46**, 1842 (1967).
32. D. R. KEARNS, *J. Am. Chem. Soc.*, **91**, 1039 (1969).
33. N. A. KHAN, O. S. PRIVETT, *Hormel Instit. Ann. Rep.*, **2**, 6, (1951).
34. N. A. KHAN, W. O. LUNDBERG, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 1779 (1954).
35. A. U. KHAN, M. KASHA, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 3292 (1970).
36. P. F. KNOWLES, J. F. GIBSON, R. C. BRAY, *Biochem. J.*, **53**, 111 (1969).
37. I. KRJALIC, L. LINDQUIST, *Photochem. Photobiol.*, **20**, 351 (1974).
38. R. LIVINGSTON, *J. Chim. Phys.*, **887** (1958).
39. W. O. LUNDBERG, „Autoxidation and Antioxidants", New York, Interscience, cap. 7, vol. 1 1961.
40. W. O. LUNDBERG, in „Lipids and their Oxidation", edit. H. W. Schultz, AVI Publ., Westport, p. 31 1962.
41. K. MAEDA, T. MISHIMA, T. HAGASHI, *Bull. Chem. Soc. Japan*, **47**, 334 (1974).
42. J. F. MEAD, *Science*, **115**, 470 (1952).
43. D. E. MOORE, *J. Pharm. Sci.*, **65**, 1447 (1976).
44. R. NILSSON, Thesis, University of Stockholm, 1969.
45. R. NILSSON, P. B. MERKEL, D. R. KEARNS, *Photochem. Photobiol.*, **16**, 109 (1972).
46. R. NILSSON, P. B. MERKEL, D. R. KEARNS, *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 1030 (1972).
47. R. NILSSON, D. R. KEARNS, *Photochem. Photobiol.*, **17**, 65 (1973).
48. R. OLINESCU, S. NITA, T. TEODOSIU, *Rev. roum. Biochim.*, **13**, 123 (1976).
49. R. OLINESCU, T. TEODOSIU, S. NITA, *Rev. roum. Biochim.*, **14**, 43 (1977).

Scanned with OKEN Scanner

50. L. PACKER, D. W. DEAMER, R. L. HEATH, *Advan. Gerontol. Res.*, **2**, 77 (1967).
51. G. PORTER, M. WRIGHT, *Faraday Discuss. Soc.*, **27**, 18 (1959).
52. W. A. PRYOR, *Fed. Proc.*, **32**, 1862 (1973).
53. E. I. RABINOWITCH, „Photosynthesis and Related Processes", vol. II, Interscience Publ., cap. 35 1956.
54. H. R. RAWLS, P. J. VAN SANTEN, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **171**, 135 (1970).
55. S. RICHARDS, H. MELVILLE, *J. Chem. Soc.*, 964 (1954).
56. J. RICHLY, I. MATSOVA, *J. Polim. Sci.*, **57**, 139 (1977).
57. J. RIGAUDY, D. SPARFEL, *Bull. Soc. Chim. France*, **9**, 3441 (1972).
58. F. RIZZUTO, J. D. SPIKES, *Rad. Environ. Biophys.*, **12**, 217 (1975).
59. I. SAITO, G. ABE, T. MATSURA, *Tetrahedron Lett.*, 4001 (1974).
60. G. O. SCHENCK, *Naturwiss.*, **40**, 205 (1953).
61. G. SCHOLNHAMMER, P. HEMMRICH, *Eur. J. Biochem.*, **44**, 561 (1974).
62. D. SLAWINSKA, I. SLAWINSKI, *Nature*, **213**, 902 (1967).
63. D. SLAWINSKA, I. SLAWINSKI, *Acta Biochim. Polon.*, **16**, 347 (1969).
64. D. SLAWINSKA, I. SLAWINSKI, *Acta Univ. Lodz.*, **11**, 203 (1977).
65. V. SLAWSON, A. W. ADAMSON, *Lipids*, **11**, 472 (1976).
66. S. G. SLIGAR, J. D. LIPSCOMBE, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **61**, 290 (1974).
67. H. H. SLIGER, W. H. BIGGLEY, J. P. HAMMAN, *Science*, **185**, 253 (1974).
68. J. D. SPIKES, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **244**, 496 (1975).
69. E. W. R. STEACIE, „Atomic and Free Radical Reactions", Reinhold, New York p. 268 1954.
70. R. H. STEELE, A. R. SHOAF, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **61**, 1363 (1974).
71. B. STEVENS, J. A. ORS, *J. Phys. Chem.*, **80**, 2164 (1976).
72. D. I. TAUBER, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 701 (1978).
73. N. J. TURRO, „Molecular Photochemistry", Berymann, New York, cap. 5, 6 (1965).
74. N. J. TURRO, A. A. LAMOLA, „Science of Photobiology", Edit. K.C. Smith, Plenum, New York p. 63 (1977).
75. Y. USUI, K. KAMAGAWA, *Photochem. Photobiol.*, **19**, 245 (1974).
76. Y. USUI, Y. TERAO, S. MATSUHITA, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **54**, 234 (1977).
77. Y. G. VORTOV, J. S. JDANOV, *Khim. Vos. Energ.*, **5**, 466 (1971).
78. R. P. WAYNE, „Photochemistry", Elsevier, New York, cap. 4—7, 1970.
79. D. WARSHAWSKY, E. KERNS, M. J. BISSEL, *Biochem. J.*, **164**, 198 (1977).
80. R. S. WEENING, R. WELTER, D. ROOS, *J. Lab. Clin. Med.*, **85**, 245 (1975).
81. G. WETTERMARK, S. E. BROLIN, *Cell Molec. Biol.*, **22**, 329 (1977).
82. V. R. WHITE, J. M. FITZGERALD, *Analyt. Chem.*, **47**, 903 (1975).
83. H. H. WISSER, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **171**, 108 (1970).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 5

ANTIOXIDANȚI

5.1. CARACTERISTICI ȘI CLASIFICARE

Folosirea antioxidanților, în scopul prevenirii sau inhibării peroxidării și implicit a autooxidării, s-a impus din necesități economice, și cercetările în acest domeniu au evoluat paralel cu studiul proceselor asupra cărora acționează. După cum peroxidarea și autooxidarea sînt procese complexe, cu variate aspecte intrinsece și dependente de factori externi, și antioxidanții vor acționa diferit. Pentru prevenirea autooxidării unor substraturi favorabile s-au utilizat diferite procedee:

1) Îndepărtarea oxigenului atmosferic prin evacuarea aerului din recipientele de prelucrare și folosirea unei atmosfere de azot. Fierberea apei și barbotarea ei cu N_2 sau CO_2 sînt procedee larg folosite în industrie pentru etapele care se pretează la acest tratament.

2) Micșorarea vitezei de reacție prin păstrarea produselor autooxidabile la rece și întuneric, ferindu-le de acțiunea prooxidantă a acestor factori. Folosirea sticlelor colorate se încadrează tot în această acțiune. Neutralizarea efectului pro-oxidant al ionilor metalici (Fe, Cu) prin utilizarea complexonilor au un efect parțial de prevenire a peroxidării.

3) Adăugarea unor substanțe cu potențial redox mai pozitiv decît al substraturilor nu a dat efectele așteptate. Deși mulți antioxidanți posedă valori ale potențialului redox între −0,6—0,8 V [31], relația între eficiența antioxidanților și potențialul redox nu este obligatorie.

O primă caracteristică a antioxidanților este eficiența lor la concentrații mici, variind cu natura lor sau a proceselor unde sînt utilizați. În general sînt adăugați în concentrații între 0,05—0,1%, dar sînt cazuri cînd se folosesc concentrații mai mari de 1—2%. Protecția oferită de un antioxidant crește odată cu concentrația lui pînă la o limită, dependentă de natura lui și a procesului în care este utilizat. Adăugarea unei cantități mai mari de această limită poate duce chiar la creșterea autooxidării, datorită oxidării crescute a componenților mediului.

În al doilea rînd, antioxidantul fiind preferențial oxidat va lua parte la procesul de autooxidare și își va exercita acțiunea atît timp cît se găsește în mediul de reacție. După epuizarea antioxidantului, procesul de autooxidare va avea loc cu o viteză egală cu cea în absența lui.

În al treilea rînd, antioxidanții se deosebesc între ei după structura, mecanismul de acțiune și concentrația la care sînt eficienți. În general se disting două mecanisme de acțiune ale antioxidanților. Un prim mecanism implică formarea unor radicali liberi ce întrerup procesul de autooxidare în lanț îndepărtînd din mediul de reacție radicalii alchil și alchilperoxi ce inițiază etapa de propagare (5.2). Al doilea mecanism previne intrarea

Scanned with OKEN Scanner

radicalilor peroxi în lanţul autooxidării (5.3). Felul cum acţionează antioxidanţii şi diferenţa dintre cele două mecanisme rezultă din fig. 5.1. Se observă că în ambele mecanisme, antioxidanţii acţionează la nivelul perioadei de inducţie a autooxidării (Capitolul 2). Pentru o substanţă ce se oxidează se obţine curba A, în care x marchează sfîrşitul perioadei de inducţie. Dacă antioxidantul inhibă autooxidarea, perioada de inducţie se prelungeşte pînă în y. Antioxidanţii care previn autooxidarea deplasează

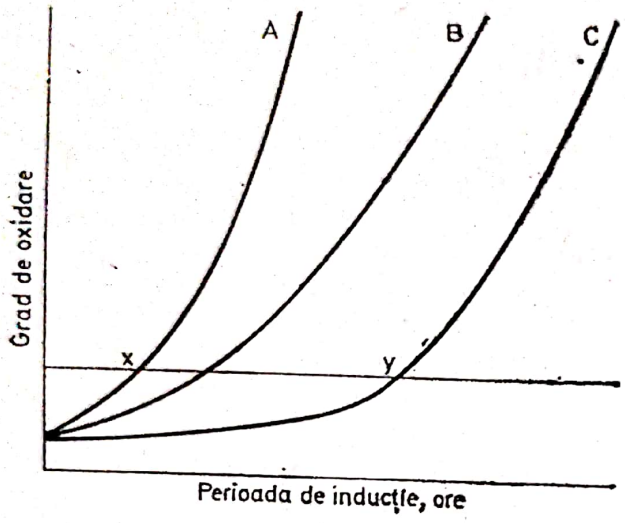


Fig. 5.1. Mecanismele de acţiune ale antioxidanţilor. A. în absenţa antioxidanţilor, B. antioxidanţi ce previn peroxidarea, C. antioxidanţi ce întîrzie peroxidarea.

de asemenea perioada de inducţie (curba B). Deplasarea perioadei de inducţie va fi mai mare cu cît creşte concentraţia antioxidantului.

Deoarece perioada de inducţie a autooxidării se caracterizează prin formarea şi acumularea radicalilor peroxi (Capitolul 2), antioxidanţii vor acţiona asupra reacţiilor menţionate şi capacitatea de reacţie a lor cu aceşti radicali va constitui eficienţa antioxidanţilor [19, 42].

Clasificarea antioxidanţilor depinde de mecanismul lor de acţiune şi de provenienţă (naturali sau sintetici). Cu toate că există o mare diversitate în structura antioxidanţilor, derivaţii fenolici şi aminele formează majoritatea acestor compuşi. Din considerente economice şi de toxicitate numărul antioxidanţilor folosiţi în industrie sau în cercetare este mult mai mic decît compuşii descoperiţi. Deoarece antioxidanţii curent utilizaţi au denumiri abreviate, prezentăm doar o listă a compuşilor, urmînd ca aceasta să fie completată odată cu studierea mecanismelor de acţiune din cadrul secţiunilor următoare.

Antioxidanţi sintetici: 2-*tert*-butil-4-hidroxianisol (BHA), 2,6-dibutilhidroxi toluen (BHT), *tert*-butilhidrochinonă (TBHQ), butilmetoxifenol (BMP), acid nordihidroguaiaretic (NDGA), α-tocoferol (vitamină E), esteri ai acidului galic (propilgalat PG), β-naftol, palmitat de ascorbil, 2,2′, 3,3′-tetrahidroxi-5,5′-dimetilbifenil (TDBP) etc. Formulele acestor principali antioxidanţi sînt prezentate în fig. 5.2. S-au folosit abrevierile internaţional utilizate. O listă completă a antioxidanţilor şi a proprietăţilor fiecăruia se găseşte în referatele recomandate [10, 13, 31, 41].

Antioxidanţii naturali sînt răspîndiţi mai ales în regnul vegetal. Menţionăm guma guaiac, extracte de ovăz, orz, tărîţe de orez, cuişoare, scorţişoară, extracte din frunze de citrice, măslin, cacao, nucă de betel. Aceste

Scanned with OKEN Scanner

extracte conţin un amestec complex de flavonoizi (quercitina), taninuri, fosfolipide, carotenoizi şi tocoferoli [12, 31]. În regnul animal principalii antioxidanţi sînt tocoferoli (vitamina E), acid ascorbic, vitamina A şi retinol [25], unele lipide saturate, derivaţi ai triptofanului [22]. Sistemele antioxidante biologice vor fi discutate în Capitolul 9.

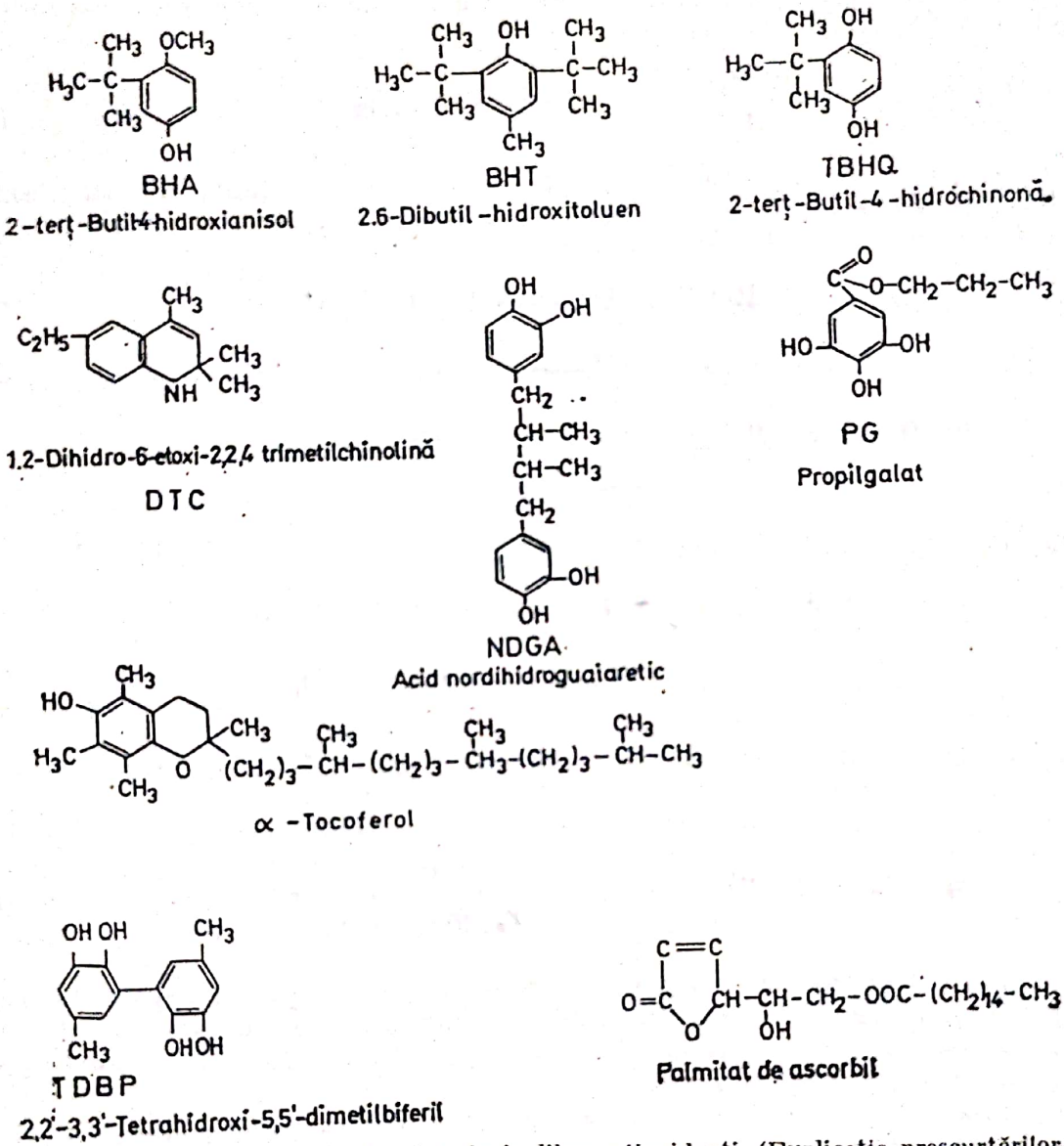


Fig. 5.2. Formulele structurale ale principalilor antioxidanţi. (Explicaţia prescurtărilor este trecută în text.)

Eficienţa antioxidanţilor se determină prin măsurarea conţinutului în peroxizi după terminarea perioadei de inducţie [27], cîntărirea probei înainte şi după diferite perioade de timp de la incubare în cuptor cu ventilaţie la 60°C [23], combinată şi cu determinări de peroxizi [24]. Moore [32] a descris un aparat pentru evaluarea eficienţei antioxidanţilor în reacţii de fotosensibilizare a unor medicamente.

Scanned with OKEN Scanner

5.2. MECANISM PRIN ÎNTRERUPEREA AUTOOXIDĂRII ÎN LANȚ

Eficiența inhibitoare puternică a unor concentrații mici de antioxidanți a fost explicată satisfăcător în urma lucrărilor fundamentale, în special ale lui Bolland, Bateman, Tobolsky, Uri (Capitolul 2) asupra autooxidării și propagării în lanț. Astfel, în absența unui antioxidant, viteza dezvoltării autooxidării în lanț va fi dată de relația generală (8), Capitolul 2, simplificată sub forma:

$$\frac{d[O_2]}{dt} = r_u = k_3 k_6^{-1} r_i^{1/2} [RH] \tag{1}$$

în care r_i este viteza totală a inițierii autooxidării în lanț, RH substanță autooxidabilă și AH antioxidant. Compușii cu activitate antioxidantă pot interveni mai ales în două reacții:

$$ROO^{\cdot} + AH \xrightarrow[k_7]{} ROOH + A^{\cdot} \tag{2}$$

$$R^{\cdot} + AH \xrightarrow[k_8]{} RH + A^{\cdot} \tag{3}$$

urmate de o reacție de terminare de forma:

$$2A^{\cdot} \xrightarrow[k_9]{} \text{Produse stabile} \tag{4}$$

Cînd $k_7 \gg k_8$, viteza autooxidării inhibate va fi dată de relația:

$$r_a = r_u^2 k_6 k_3^{-1} k_7^{-1} [RH]^{-1} [AH]^{-1} \text{ sau}$$

$$k_6 k_3^{-1} k_7^{-1} = \frac{r_a}{r_u^2} [AH] [RH] = K \tag{5}$$

Cînd $k_8 \gg k_7$, viteza autooxidării inhibate (r_a) va fi dată de relația:

$$r_a = r_u^2 k_6 k_2 k_3^2 k_8^{-1} [O_2][RH]^{-2} [AH]^{-1} \text{ sau}$$

$$k_6 k_2^{-1} k_3 - 2k_8^{-1} [O_2]_{100\ mm} = \frac{r_a}{r_u^2} \cdot \frac{100}{pO_2} [RH]^2 [AH]^{-1} = K' \tag{6}$$

Ecuațiile (5) și (6) au fost verificate experimental [3] și constanta $1/K$ reprezintă o măsură a eficienței ruperii autooxidării în lanț a antioxidantului, așa cum reiese și din tabelul 5.1, ce prezintă un studiu comparativ pe antioxidanți de tip fenolic [11, 34].
Din tabelul 5.1 se poate observa și o relație între constanta $1/K$ și potențialul redox menționată în secțiunea precedentă, dar neaplicabilă și la alte grupuri de antioxidanți.

Cinetica acțiunii antioxidanților este complicată și de incertitudinea formării radicalilor A· [47], cît și de soarta acestora. Pe lîngă existența ecuațiilor (2—4) trebuiesc luate în considerație și relațiile

$$A^{\cdot} = ROO^{\cdot} \longrightarrow AOOR^{\cdot} \tag{7}$$

$$A^{\cdot} + RH \xrightarrow[k_{10}]{} AH + R^{\cdot} \tag{8}$$

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 5.1.

Eficiența unor fenoli ca antioxidanți (după Scott [41])

Antioxidant	$1/K$	$k_7k_3^{-1}$	E_0(V)
Fenoli			
Rezorcinol	1,6	—	1,179
β-Naftol	7,7	15	1,153
α-Naftol	56	71	0,933
Pirogalol	300	—	0,676
Hidrochinone:			
Catechol	63	—	0,810
Hidrochinonă	100	100	0,715
Trimetilhidrochinonă	570	—	0,528

ceea ce duce la complicarea ecuației vitezei în autooxidarea inhibată (r_a)

$$r_a = r_i + k_3k_7^{-1}\,[\mathrm{RH}][\mathrm{AH}]^{-1} + r_ik_{10}k_9^{-1}V^{-1/2}\,[\mathrm{RH}]^{-1} \qquad (9)$$

în care V reprezintă volumul mediului de reacție.

Activitatea antioxidantă pare să fie o rezultantă a două procese opuse; unul care face ca antioxidanții să deactiveze radicalii peroxi după (4) și (7) și altul prin tendința radicalului A· să continue lanțul autooxidativ, conform reacțiilor (2, 3 și 8). Deosebirea între un inhibitor și un antioxidant ce întîrzie peroxidarea poate fi efectuată prin compararea curbei de autooxidare (fig. 5.1). Ideal, inhibitorul ar trebui să nu producă o absorbție de oxigen în perioada cînd acționează, datorită inhibării peroxidării și a unui transfer în lanț neglijabil. În cazul al doilea, în perioada de inducție se produce un consum măsurabil de O_2 drept consecință a unui transfer în lanț. Utilizarea antioxidanților în scopuri industriale a arătat că antioxidanții au comportări variate în funcție de materialele care le protejează. Astfel, în poliolefine și produse petrolifere antioxidanții acționează ca inhibitori, iar în cauciucul vulcanizat ca substanțe ce întîrzie autooxidarea.

În timpul acțiunii lor, antioxidanți fenolici și amine aromatice formează dehidrodimeri cu masă moleculară mare. Goldschmidt [15] a arătat formarea acestor dimeri prin asocierea radicalilor liberi. Antioxidanții de tip arilamine formează tetrafenilhidrazine prin dimerizarea radicalilor diarilamino produși inițial [4]. În multe cazuri o parte din antioxidantul folosit este polimerizat în gudroane din care produșii puri nu pot fi separați. Formarea dimerilor se produce în proporție mai mare la antioxidanți fenolici substituiți în pozițiile 2, 4, 6. Structurile acestor antioxidanți și a dimerilor formați sînt prezentate în fig. 5.3.

O trăsătură caracteristică antioxidanților de tip fenolic este ineficiența lor la temperaturi depășind 100°C. Deși acești antioxidanți îndepărtează eficient radicalii alchilperoxi ei formează noi radicali A· și dimeri care pot fi noi inițiatori de autooxidare în lanț. La temperaturi mai mici acești noi produși nu vor fi în cantitate suficientă ca să inițieze noi reacții

Scanned with OKEN Scanner

în lanț. Dar la temperaturi peste 100°C va crește formarea dimerilor, mai ales de forma III fig. 5.3, cît și disocierea radicalilor alchilperoxi

$$ROOH \longrightarrow RO^{\cdot} + OH^{\cdot} \xrightarrow{2AH} ROH + H_2O + 2A^{\cdot} \qquad (10)$$

Dacă un antioxidant de acest tip va produce dimeri de forma I există toate șansele ca să fie ineficient la temperaturi mari.

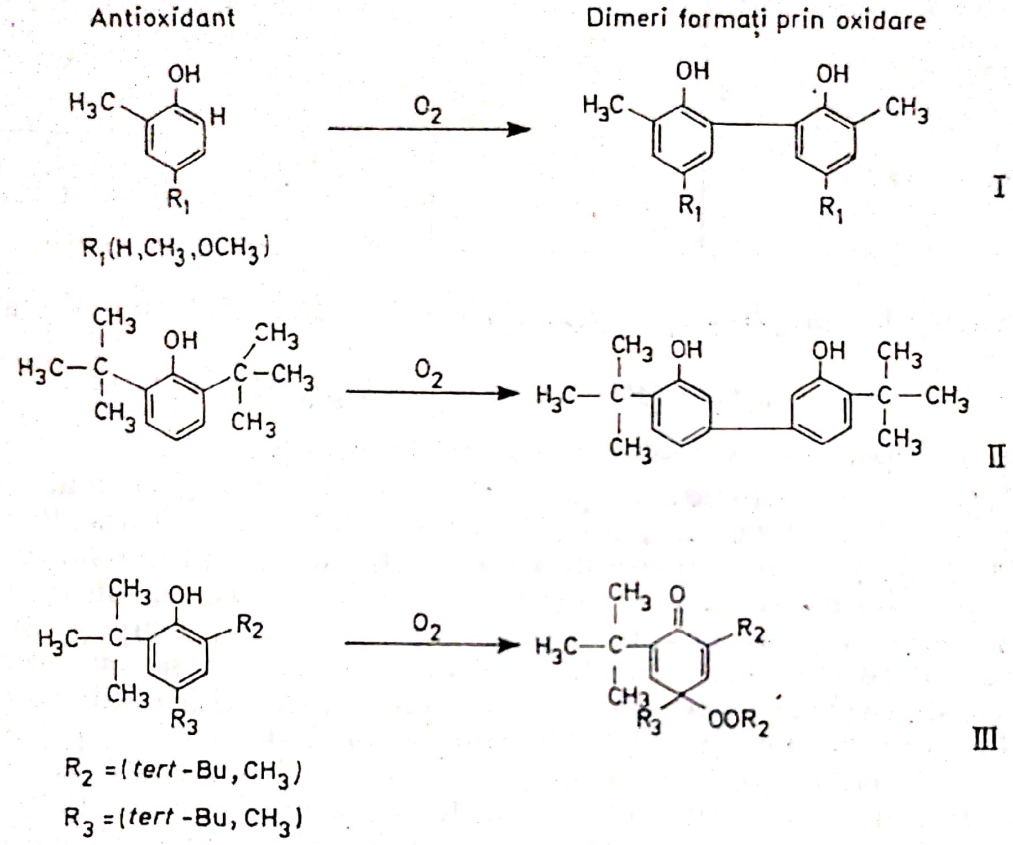


Fig. 5.3. Antioxidanți fenolici 2, 4, 6-substituiți și produșii rezultați în cursul oxidării.

Antioxidanții de tip amine aromatice (*N*,*NN*,*N*-tetrametil-*p*-fenilendiamină) produc în timpul acțiunii lor radicali ionici de tip Wurster (fig. 5.4.A) pe lîngă alți produși secundari [5]. Studiile asupra unor amine aromatice [20, 31] au arătat că viteza autooxidării inhibată este invers proporțională cu rădăcina pătrată a concentrației aminei, sugerînd că interacția dintre radicalii alchilperoxi și amină este de ordinul doi față de ROO·. Stoichiometria reacției (fig. 5.4. B) indică consumul a doi radicali ROO· pentru 1 mol amină, cît și formarea unei chinonimine ca produs principal.

5.3. MECANISME DE PREVENIRE

În capitolele 2 și 3 s-a arătat că factorii prooxidanți cum sînt căldura, lumina și ionii metalici acționează prin favorizarea apariției radicalilor liberi, în special a peroxizilor. Acești factori vor acționa diferit în funcție

Scanned with OKEN Scanner

de natura substraturilor supuse autooxidării. Astfel căldura și ionii metalici acționează mai ales în uleiuri și produse petrolifere, lumina contează pentru polimeri ce conțin carbonili, căldura, metale și ozonul acționează mai ales asupra cauciucului, iar lumina și căldura influențează macropolimeri alcătuiți din hidrocarburi.

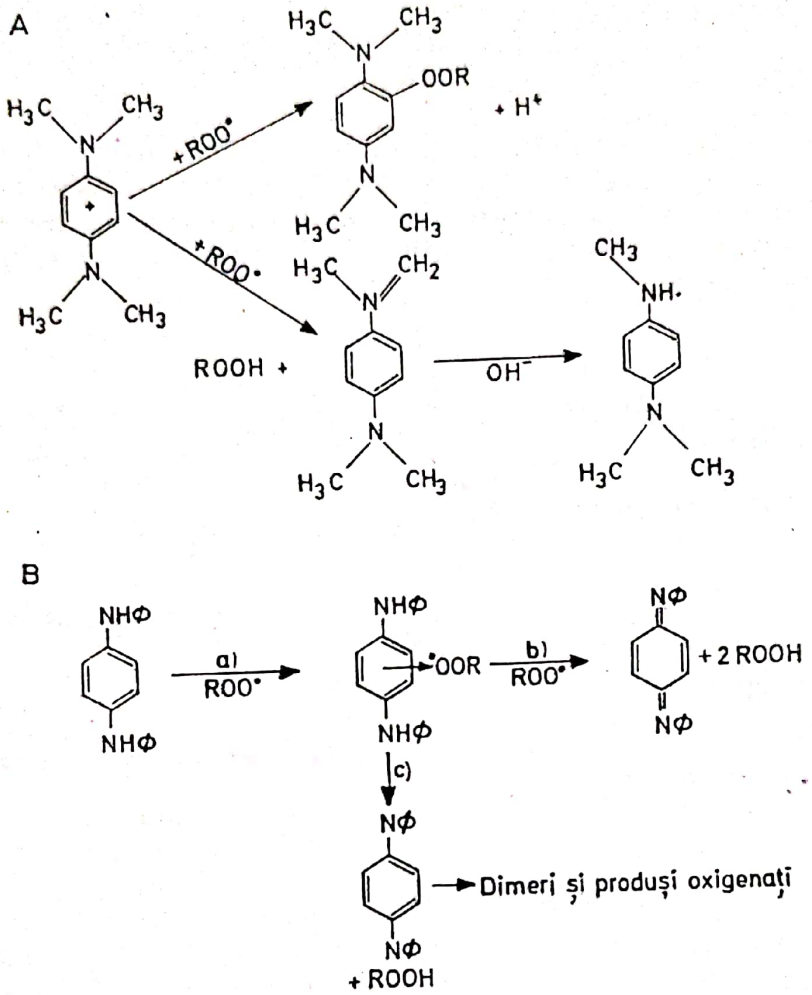


Fig. 5.4. Mecanismul de acțiune al antioxidanților de tip amine aromatice și formarea produșilor secundari. A. *N*, *N'*-tetrametil-*p*-fenilendiamină; B. *N*, *N'*-difenil-*p*-fenilendiamină

5.3.1. DEACTIVATORI AI IONILOR METALICI

După cum s-a arătat în Capitolul 3.3, ionii metalici exercită un efect prooxidant prin formarea unor complecși de coordonare instabili cu radicalii alchilperoxi urmat de un transfer de electroni și apariția radicalilor liberi. Eficiența unui ion metalic ca prooxidant depinde probabil de capacitatea de coordonare și de potențialul redox al metalului din complex. În acest sens, inhibarea sau prevenirea unor peroxidări de acest tip poate fi îndeplinită ori printr-o complexare puternică la un număr maxim de coordonare sau prin stabilizarea unei trepte de valență.

Scanned with OKEN Scanner

În formarea unui complex coordonat, ionul metalic funcționează ca un acid tip Lewis, iar ligandul ca o bază tip Lewis și s-a găsit o relație între stabilitatea complexului și structura donorului de electroni. Calvin și Bailes [8] au arătat că grupările puternic donoare de electroni (OCH_3) formează complecși stabili. Eficiența unui deactivator este exprimată în procentul restabilirii perioadei de inducție a produsului

$$E_p = \frac{c-b}{a-b} \times 100\% \qquad (11)$$

în care a = perioada de inducție a produsului fără antioxidant, b = perioada de inducție în prezența unei concentrații de ion metalic prooxidant, c = perioada de inducție în prezența ionului metalic și a deactivatorului. În fig. 5.5 sînt prezentați principalii deactivatori mai eficienți și valoarea E_p respectivă [48].

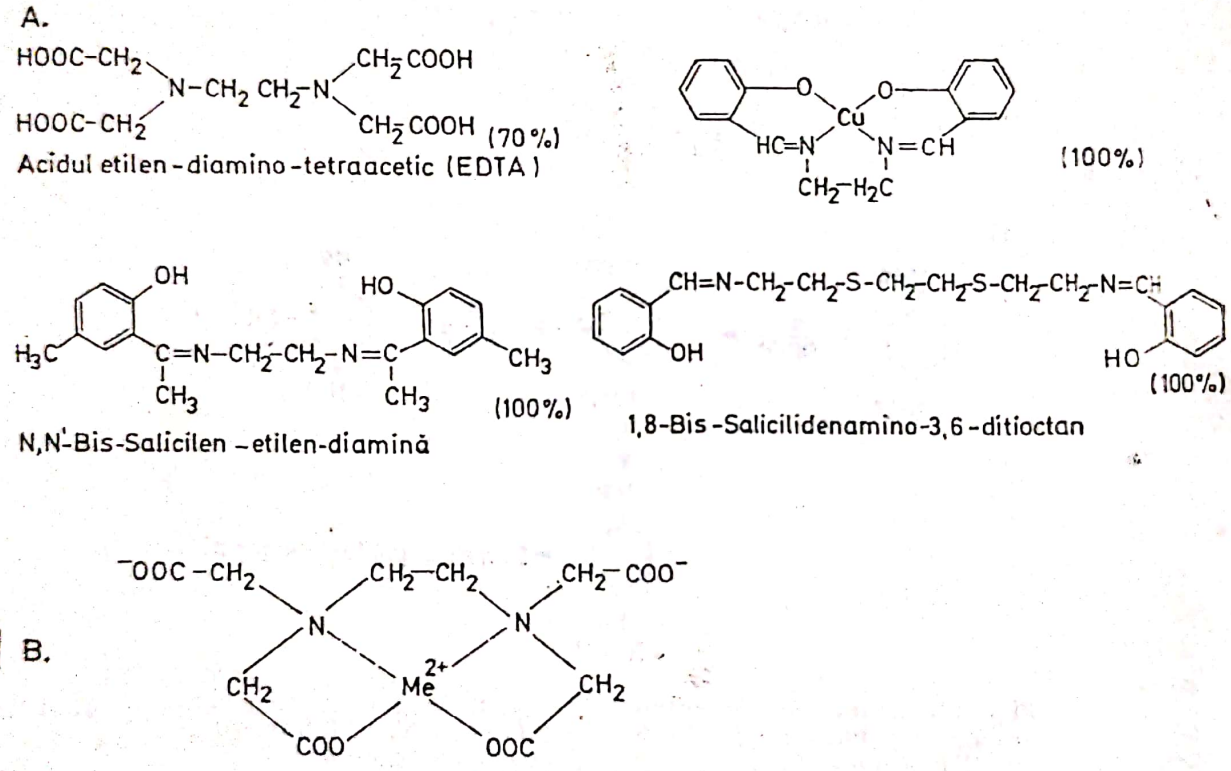


Fig. 5.5. A. Principalii agenți complexanți folosiți ca deactivatori. În paranteză este menționată valoarea procentuală a constantei E_p. B. Complexarea de către EDTA a ionilor metalici bivalenți.

Ulterior, s-a găsit [40] că în deactivarea ionilor metalici mai intervin dimensiunea complexului, aranjamentul steric al liganzilor în jurul ionului metalic, schimbarea entropiei complexului etc. [44].

5.3.2. DEACTIVATORI AI RADIAȚIILOR ULTRAVIOLETE

Rolul important al hidroperoxizilor formați în cursul reacțiilor de fotosensibilizare a fost discutat în capitolul 4. Grupările cromofore cele mai

frecvente în polimeri sînt carbonilii, în special dialchil cetonele absorb rapid radiaţii UV în regiunea 330 nm. Cetonele aromatice constituie agenţi eficienţi pentru extragerea atomilor de hidrogen şi iniţiatori ai polimerizării sub acţiunea luminii [36]. În schimb *o*-hidroxibenzofenonele care au maxime de absorbţie la 250, 285 şi 340 nm constituie grupa deactivatorilor UV cea mai importantă (fig. 5.6 A). Dezexcitarea produsă de acest grup de substanţe se datoreşte probabil posibilităţii de izomerizare în enol chinonă şi de transfer de energie (fig. 5.6. B).

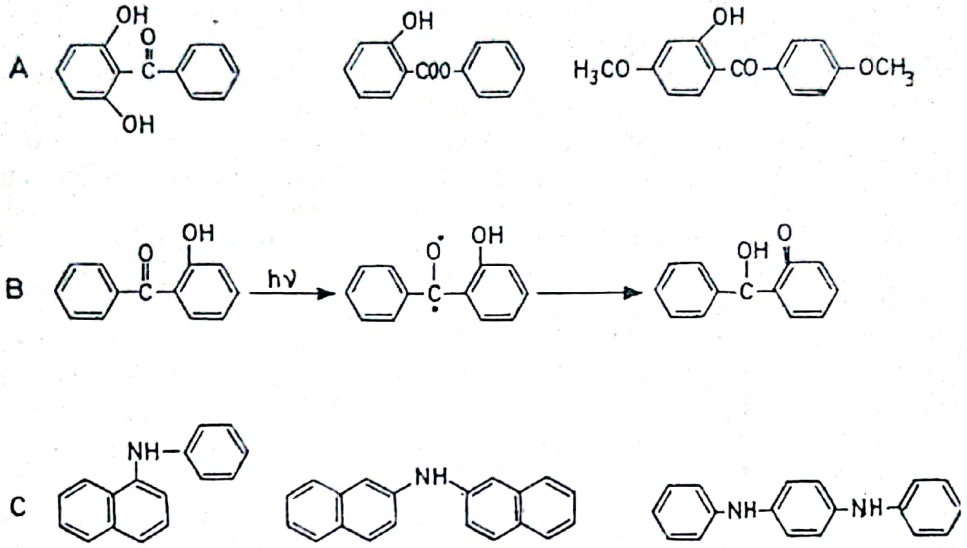


Fig. 5.6. Deactivatori ai absorbţiei în ultraviolet. A. Exemple de *o*-dihidroxibenzofenone folosite în polietilene B. Mecanismul de acţiune al *o*-dihidroxibenzofenonelor. C. Amine aromatice cu caracter antioxidant folosite în protejarea cauciucului vulcanizat

Se cunosc un număr mare de substanţe ce absorb în UV, dar şi în partea vizibilă a spectrului şi folosirea lor modifică proprietăţile produselor pe care le protejează. Astfel, trebuie menţionat în primul rînd pulberea fină de cărbune cu excelente proprietăţi de antioxidant şi absorbţie în UV larg folosit în cauciuc şi unii polimeri. Sărurile de nichel ale dibutilditiocarbamatului şi ale fenilazo-β-naftolului se apropie în proprietăţi de cărbune. O piedică în folosirea acestor substanţe este însă coloraţia lor puternică şi în consecinţă s-au testat alţi compuşi în special amine aromatice şi cu proprietăţi antioxidante (fig. 5.6. C).

Efectele radiaţiilor UV asupra polimerilor depind, de asemenea, şi de forma fizică a acestora. Cum degradarea este proporţională cu intensitatea radiaţiei, într-un material slab absorbant peroxidarea va fi uniformă în toată masa. În schimb pentru un polimer puternic absorbant majoritatea degradării va avea loc la suprafaţă şi un antioxidant dizolvat în toată masa polimerului va fi neeficient [30, 41].

5.3.3. SUBSTANŢE CE DESCOMPUN PEROXIZII

Grant şi Tipper [17] au arătat că în timp ce acizii tricloracetic, butiric inhibă autooxidarea difenilmetanului şi distrug peroxizii existenţi iniţial, alţi acizi carboxilici (benzoic, fenilacetic) acţionează ca prooxidanţi.

Scanned with OKEN Scanner

Acest ultim efect pare asociat cu un transfer în lanț implicînd radicalul carboxil stabilizat prin rezonanță [21].

O comportare asemănătoare, dar mult mai complexă, s-a observat în cazul unor sulfuri organice. În timp ce compusul derivat al naftalinei $C_{10}H_9S—C_6H_5$ produce un consum rapid de O_2 urmat de o descompunere a peroxizilor formați, disulfura alifatică $(C_{16}H_{35})_2S$ descompune peroxizii inițial formați. Alte sulfuri active au structuri diferite cum sînt *tert*-butil—S-*tert*-butil, *n*-butil—S—O—S—*n*-butil, $C_2H_5—S—(CH_2)CH_2COC_6H_5$ [46, 30]. În cursul reacției cu peroxizi aceste sulfuri sînt transformate în sulfoxizi și sulfone, care și ele pot fi antioxidanți. Ditiofosfații și ditiocarbamații prezintă de asemenea proprietăți antioxidante, ca și disulfurile complexe de forma $(n\text{-butil}_2NCSS)_2Zn$. Încercările de a găsi o relație structurală între aceste sulfuri și activitatea antioxidantă nu au dus la concluzii clare [2]. Au fost implicate astfel numărul de atomi de carbon ce despart gruparea carbonil de atomul de sulf, formarea unui complex între o α-ceto disulfură și moleculele solventului, apariția unui radical tiil care ar reacționa cu radicalul peroxi, formarea SO_2 care ar fi în realitate compusul activ în descompunerea peroxizilor etc. [6].

Studiile cinetice, deși dificile, au arătat o caracteristică deosebită a acestor compuși. Spre deosebire de antioxidanții care inactivează radicalii peroxi și care au o perioadă de inducție proporțională cu concentrația inhibitorului (cel puțin pentru concentrații mici de AH), pentru antioxidanții ce descompun peroxizii perioada de inducție este proporțională cu concentrația inhibitorului la pătrat [14].

Amine alifatice terțiare, benzilamină, *N*,*N*-dimetilanilină descompun hidroperoxizii și diperoxizii în compuși neperoxidici, conform relației:

$$ROOH + R'_3N \longrightarrow ROH + R'_3NO \qquad (12)$$

De asemenea, etilendiaminele reacționează cu hidroperoxizii formînd sisteme redox puternice capabile să inițieze polimerizare prin radicali liberi mai ales în prezența unor ioni metalici [26]. Antioxidanții de tip fenolic cei mai larg utilizați în ultimul timp sînt α-tocoferol, NDGA, hidrochinonă etc. Se pare că adevăratul agent este radicalul ariloxi format din dehidrogenarea antioxidanților ca în cazul altor *p*-*tert*-alcoxifenoli [45].

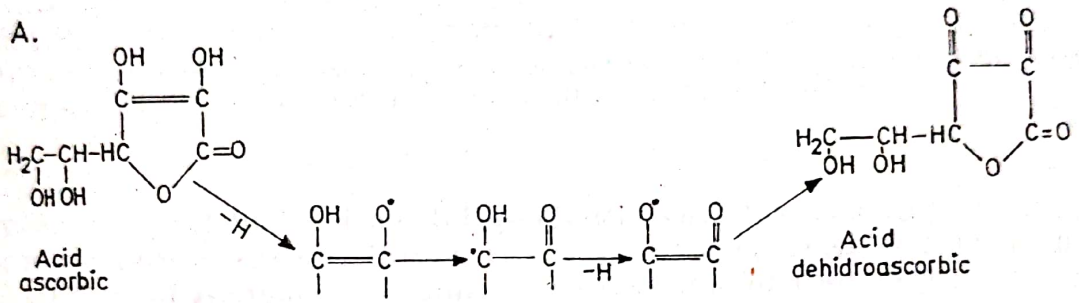
5.4. SINERGISM ÎN ACȚIUNEA ANTIOXIDANȚILOR

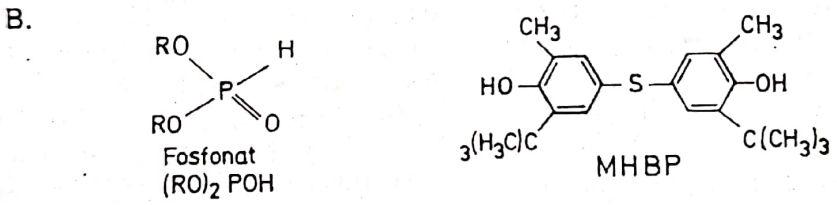
Cele două grupe de antioxidanți, care acționează după mecanisme diferite, de întrerupere a autooxidării în lanț și preventiv, interferă în diferite etape ale autooxidării producînd efecte aditive. De exemplu, etapa autocatalitică este absentă în autooxidarea catalizată de UV sau de ioni metalici a cauciucului și antioxidanții ce întrerup lanțul autooxidativ nu sînt eficienți. În schimb cei care descompun peroxizii își păstrează capacitatea antioxidantă la temperaturi mari sau în prezența UV ori a ionilor metalici. Dealtfel grăsimile și uleiurile vegetale și animale conțin un amestec de factori prooxidanți și antioxidanți ce acționează după mecanisme diferite și în care factorii externi decid deplasarea echilibrului dintre acești factori. În plus concentrația locală a unui antioxidant poate determina

Scanned with OKEN Scanner

un efect prooxidant, așa cum este cazul compușilor ce conțin gruparea hem (hemoglobina), care în concentrații de 10^{-6}—10^{5}M exercită un efect prooxidant, iar la concentrații în jur de 10^{-3} M au un efect antioxidant, catalizînd descompunerea peroxizilor [29]. Sinergismul însă presupune o completare reciprocă a acțiunii protectoare exercitată de doi antioxidanți ce posedă mecanisme diferite.

Astfel, se distinge în primul rînd un homo-sinergism ce implică acțiunea după același mecanism a unui antioxidant puternic și a unuia slab. În hetero-sinergism cei doi antioxidanți acționează după mecanisme diferite. Acidul ascorbic constituie exemplul cel mai interesant de sinergism în compania antioxidanților fenolici sau a aminelor aromatice în produse extrem de variate cum sînt petrolul și alimentele. Acidul ascorbic deși nu este un fenol are reacții de oxidare asemănătoare în sensul formării intermediare a unor forme stabilizate prin rezonanță și în final a unei dicetone (fig. 5.7. A). În plus, acțiunea lui în produse organice sau medii





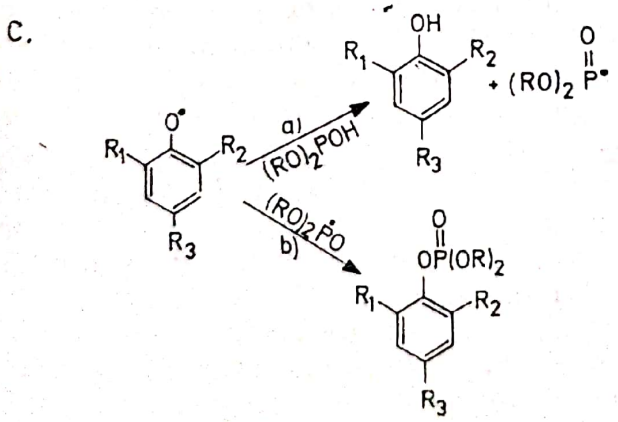


Fig. 5.7. Substanțe cu acțiune sinergică antioxidantă. A. Acidul ascorbic și mecanismul de oxidare. B. Fosfonat, formulele brute și structurale, cît și structura MHBP (3-metil-4-hidroxi-5-tert-butilfenil) sinergic în amestec cu fosfonați. C. Mecanismul acțiunii fosfonaților $(RO)_2POH$ cu un radical fenoxi. În (B) fosfonații acționează sub formă chinoidă [38].

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 5.1.

Compoziția unor amestecuri sinergice de antioxidanți

Primul component	Al doilea component	Perioada de inducție (ore)	Autor
α-Tocoferol 0,3 %	—	11	[16]
α-Tocoferol 0,3 %	Acid ascorbic 0,05 %	59	[16]
α-Tocoferol 0,3 %	Acid fosforic 1,7 %	25	[16]
MHBP (raport molar 0,9)	1,6-Dimetilheptil fosfonat	100	[37]
MHBP	Izobutil fosfonat	140	[37]
MHBP	*terț*-Butil-fosfonat	208	[37]
α-Tocoferol	Acid citric 0,01 %	20	[16]
Zn dibutilditiocarbamat 0,5 %	2-Hidroxi-4-*n*-dodeciloxibenzofenonă 1 %	30	[41]

Amestecurile pe bază de α-tocoferol au fost testate pe acizi grași din untură, cele cu MHBP (3-metil-4-hidroxi-5-*terț*-butilfenil, fig. 5.7. B) față de uleiuri minerale și ultimul față de polietilenă.

biologice a produs rezultate contradictorii de antioxidant [18] sau prooxidant [33], așa încît se pare că acidul ascorbic poate prezenta ambele efecte contradictorii în funcție de prezența altor compuși în mediu.

Cîteva exemple de amestecuri sinergice de antioxidanți sînt date în tabelul 5.1. α-Tocoferolul sau vitamina E este un antioxidant larg folosit în industria alimentară și a cărui capacitate poate fi semnificativ mărită prin amestec cu acizi anorganici sau organici. În timp ce în cazul amestecului cu acidul ascorbic se pare că ambii componenți se protejează în urma competiției pentru reacția oxidativă cu radicalii peroxi, acizii fosforic și citric acționează prin complexarea ionilor metalici prooxidanți. Acești acizi ca și cunoscutul agent complexant EDTA (etilendiaminotetracetic) singuri nu au capacitate antioxidantă, cu toate că îndepărtează o parte din ionii metalici. Acizii amintiți acționează sinergic și cu alți antioxidanți cunoscuți cum sînt NDGA, PG, TBHQ. De asemenea, substanțe care complexează ionii metalici cum sînt polialcoolii (sorbitol), zaharoză, lecitină [12, 49] pot acționa sinergic după același mecanism.

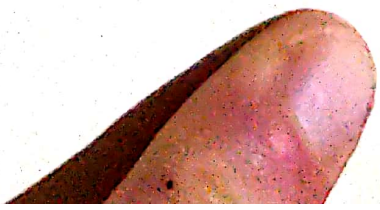
Dialhilfosfonații potențează capacitatea antioxidantă a fenolilor în special *orto*-substituiți. În tabelul 5.1. se observă și efectul variației structurii dialchilfosfonaților în combinație cu un antioxidant de tip fenolic, MHBP (fig. 5.7. B). Fosfonații acționează prin reducerea radicalului fenoxi sau a unui derivat chinoid (fig. 5.7. C). Acest mecanism este sprijinit prin reacții similare de regenerare a benzochinonelor prin reducere de către fosfonați, tioli (acid tioglicolic) sau aminoacizi (glicocol, alanină) [38]. Antioxidanți de tip amine pot fi sinergici cu fenoli *orto*-substituiți sau cu aminoacizi. Trebuie menționat că cei mai eficienți aminoacizi în combinație cu NDGA, tocoferoli sînt metionina, triptofanul și cisteina ce acționează prin dezactivarea ionilor metalici [9]. Derivații acidului ditiocarbamic, $H_2N-CS-SH$, acționează atît ca deactivatori de ioni metalici, cît și ai hidroperoxizilor.

Scanned with OKEN Scanner

Faţă de acţiunea prooxidantă a radiaţiilor UV, un amestec sinergic de Zn-dibutilditiocarbamat şi 2-hidroxibenzofenonă (tabelul 5.1) a dat rezultate satisfăcătoare în protejarea polietilenei [41]. În acest domeniu combinaţiile sinergice trebuie să acţioneze atît asupra absorbţiei UV, cît şi a deactivării ionilor metalici. Hidroxiflavonele (quercitina) constituie o grupă de antioxidanţi naturali ce acţionează după aceste mecanisme în uleiuri vegetale [43]. Recent, Cavallini şi Bindoli [7] au arătat că silimarina şi quercitina, din grupa flavonoizilor, sînt eficiente şi în captarea radicalilor peroxi din sisteme biologice in vitro, cum este acid dihidroxifumaric-Fe^{2+} şi recomandă utilizarea lor în protejarea alimentelor. Dealtfel în ultimul timp se tinde din motive de toxicitate înlocuirea antioxidanţilor sintetici de tip BHA, NDGA, BHT folosiţi pe scară largă în protejarea alimentelor cu extracte din antioxidanţi naturali cum sînt tocoferoli, caroteni sau amestecuri de fosfolipide [39]. Toxicitatea antioxidanţilor sintetici admişi pentru alimente constituie dealtfel o problemă de mare actualitate [28, 35]. Antioxidanţii naturali sau sintetici acţionează şi în sistemele defensive contra poluanţilor chimici care produc peroxizi, cum sînt unele hidrocarburi cancerigene, nitriţi sau nitrozoamine [1].

BIBLIOGRAFIE

1. B. D. ASTILL, L. T. MILLIGAN, *Food, Cosmetic Toxicol.*, **15**, 167 (1977).
2. D. BARNARD, L. BATEMAN, E. R. COLE, *Chem. Ind.*, 918 (1958).
3. J. L. BOLLAND, P. TEN HAVEN, *Discuss. Faraday Soc.*, **2**, 252 (1947).
4. C. E. BOOZER, G. S. HAMMOND, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 3861 (1954).
5. C. E. BOOZER, C. S. HAMMOND, *J. Am. Chem. Soc.*, **77**, 3233, 3380 (1955).
6. A. J. BRIDGEWATER, M. D. SEXTON, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2**, 530 (1978).
7. L. CAVALLINI, A. BINDOLI, *Pharmacol. Res., Comm.*, **10**, 133 (1978).
8. M. CALVIN, R. H. BAILES, *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 953 (1946).
9. D. F. CLAISEN, W. O. LUNDBERG, G. O. BURR, *J. Am. Chem. Soc.*, **24**, 403 (1947).
10. C. COCIASU, Informare Documentare Selectivă ICCC **1**, 1, (1977).
11. D. S. DAVIES, H. L. GOLDSMITH, A. K. GUPTA, *J. Chem. Soc.*, 4926 (1956).
12. P. A. DOWDNEY, M. L. MEANY, *Technol. Brit. Food Manuf. Assoc.*, 196 (1977).
13. M. E. ENDEAN, *Technol. Brit. Food Manuf. Assoc.*, 91 (1976).
14. E. N. FRANKEL, C. D. EVANS, *J. Agr. Food Chem.*, **7**, 438 (1959).
15. S. GOLDSCHMIDT, A. VOGT, M. A. BREDIG, *Ann*, **145**, 123 (1925).
16. C. GOLUMBIC, *Oil and Soap* **20**, 105 (1943).
17. D. D. GRANT, C. F. TIPPER, *J. Chem. Soc.*, 640 (1955).
18. B. HALLIWELL, *New Phylobiol.*, **73**, 1075 (1974).
19. R. HARDY, *Rep. Appl. Chem.*, **58**, 484 (1973).
20. L. HORNER, *J. Polymer. Sci.*, **18**, 438 (1955).
21. K. U. INGOLD, I. E. PUDDINGTON, *Ind. Eng. Chem.* **51**, 1319 (1959).
22. G. KAJIMOTO, *Eyo Shak* **30**, 291 (1977), *Chem. Abstr.*, **88**, 103413 (1978).
23. P. J. KE, R. G. AKMAN, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **53**, 636 (1976).
24. P. J. KE, D. M. NASH, R. G. AKMAN, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **54**, 417 (1977).
25. V. N. KHARTA, S. KRISHNAMURTHY, *Int. J. Vitamin. Nutr. Res.*, **47**, 394 (1977).
26. G. W. KINNERLY, W. L. PATTERSON, *Ind. Eng. Chem.*, **48**, 1917 (1958).
27. M. LAURY, *Rev. Fr. Corps Gras*, **7**, 622 (1960).
28. S. W. LESLIE, S. C. GORD, *Toxicology*, **10**, 81 (1978).



Scanned with OKEN Scanner

29. S. E. LEWIS, E. D. WILLS, *Biochim. Biophys. Acta*, **70**, 336 (1963).
30. W. O. LUNDBERG, „Autoxidation and Antioxidants", Interscience J. Wiley, New York, vol. 1, 1961.
31. S. J. MASUOKA, I. G. KAPSALIS, *J. Food Process. Preserv.*, **1**, 153 (1977).
32. D. E. MOORE, *J. Pharm. Sci.*, **65**, 1447 (1976).
33. N. NISHIKIMI, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **63**, 463 (1975).
34. S. T. OMAYE, K. A. REDDY, C. E. CROSS, *J. Toxicol. Environ. Hlth.*, **3**, 829 (1977).
35. G. PASCAL, *Rev. Fr. Corps Gras*, **25**, 239 (1978).
36. J. N. PITTS, R. L. LETSINGER, R. B. MARTIN, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 1068 (1959).
37. O. S. PRIVETT, F. W. QUACHENBUSH, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **31**, 169 (1954).
38. F. RAMIREZ, S. DERSHOWITZ, *J. Org. Chem.*, **27**, 1282 (1957).
39. N. SASHIDA, H. MITANI, *Japan Kokai*, 78.73.206 (1978).
40. G. SCHWARTZENBACH, *Helv. Chim. Acta*, **35**, 2344 (1952).
41. G. SCOTT, „Atmospheric Oxidation and Antioxidants", Elsevier, Amsterdam cap. 4, 5, 1965.
42. E. R. SHERWIN, *J. Am. Chem. Oil Soc.*, **53**, 430 (1976).
43. T. H. SIMSON, N. URI, *Chem. Ind.*, 956 (1956).
44. R. L. SMITH, „The Sequestration of Metals", Chappman and Hall, London, p. 133 (1959).
45. R. SPOLSKI, L. WILLIAMS, *Ind. Eng. Chem.*, **42**, 1847 (1950).
46. R. THOMSON, J. A. CHEMICEK, T. SYMON, *Ind. Eng. Chem.*, **44**, 1659 (1952).
47. C. WALLING, R. B. HODGSON, *J. Am. Chem. Soc.*, **80**, 228 (1958).
48. R. W. WATSON, T. B. TOM., *Ind. Eng. Chem.*, **41**, 919 (1949).
49. B. M. WATTS, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **25**, 48 (1950).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 6

APLICAȚII ÎN INDUSTRIE

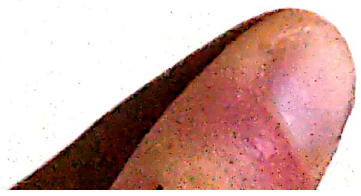
Peroxidarea, etichetată ca atare sau înglobată în denumiri mai uzuale ca autooxidare, îmbătrînire, deteriorare este la baza degradării oxidative a unor produse industriale esențiale civilizației moderne, cum sînt combustibilii din petrol, uleiuri, cauciuc, alimente, medicamente. Așa cum rezultă din capitolele anterioare, peroxidarea este un proces complex, cu multe variante dependente de structura substraturilor și de condițiile de mediu. Datorită gamei largi de produse industriale afectate, variatelor aspecte ale peroxidării, interdependenței cu alte caracteristici ce se modifică simultan, a unor detalii de strictă specialitate, în spațiul rezervat nu vom aborda decît trăsăturile generale urmînd ca cei interesați să urmărească literatura specifică menționată.

6.1. COMBUSTIBILI ȘI LUBRIFIANȚI

Principalele efecte ale peroxidării în produsele petrolifere se concretizează în formarea unor gume sau rezidii asemănătoare rășinilor ce se depun în carburator, valve, camere de combustie ori pe fundul recipientelor de depozitare. Fracțiunile proaspăt obținute din distilarea fracționată a petrolului nu conțin rezidii, care apar în urma depozitării într-o cantitate dependentă de tipul combustibilului și conținutul în olefine cu caracter nesaturat variabil. Dealtfel, industria petroliferă nu s-a putut dezvolta decît în funcție de utilizarea încă de la început a unor antioxidanți a căror eficiență este continuu îmbunătățită și a căror compoziție este protejată prin patente.

Gazele din petrol sînt formate din hidrocarburi saturate (metan, etan, butan) și gaze olefinice (etilenă, propilenă). Peroxidarea este mai puțin răspîndită și se manifestă prin formarea unui reziduu brun la orificiul de deschidere al buteliilor constituită din produși polimerizați, mercaptani. În schimb pentru benzine, peroxidarea constituie un fenomen greu de combătut. În dorința de a crește cifra octanică (capacitatea de detonare) s-a adăugat tetraetil plumb (TEL) care însă se oxidează ușor formînd derivați ce se depun și pot provoca explozii. Pentru a combate această peroxidare se adaugă antioxidanți fenolici de tipul celor menționați în fig. 6.1 sau a unor derivați fosforici ca tributil fosfat. Stabilitatea benzinelor la autooxidare depinde de temperatura ambiantă și de impurități ce pot induce peroxidarea. O stabilitate bună cere ca perioada de inducție la 100°C și presiunea O_2 de 100 psi să depășească 480 minute și reziduul să fie maximum 7 mg/dl [85]. Reziduul este un amestec complex

7 — c. 289 2



în funcţie de regiunea de unde se extrage petrolul. Hidroperoxizii alchilici reduc mult cifra octanică (7 unităţi pentru 1 meq peroxid). Substraturile favorabile peroxidării sînt constituite din limonen, diolefine, olefine, compuşi aromatici, tiofenoli, piroli etc. Susceptibilitatea la peroxidare este mult modificată prin rafinare şi tratarea chimică ulterioară pentru îndepărtarea compuşilor conţinînd sulf prin oxidarea selectivă a acestora (*sweetening*) [61]. O altă sursă de impurităţi cu caracter prooxidant este consti-

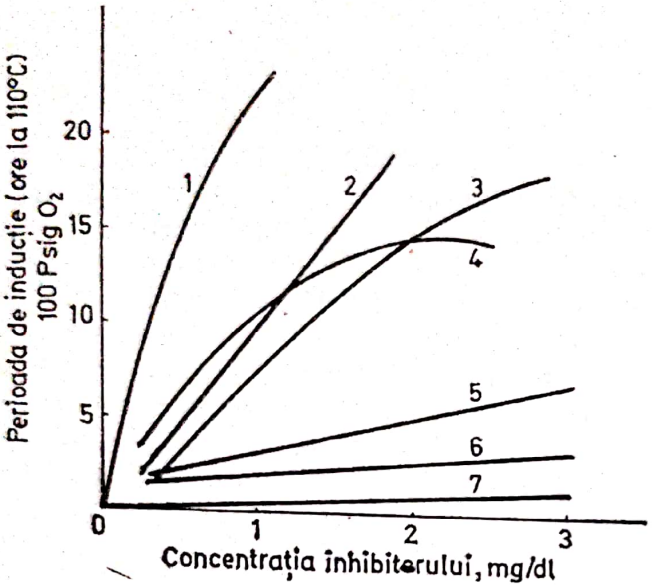


Fig. 6.1. Efectul antioxidanţilor asupra tetraetil plumb (TEL) folosit în benzine: 1. 2,4-Dimetil-6-*tert*-butilfenol; 2. N,N′-di-*sec*-butil-*p*-fenilendiamină; 3. Aldehidă izopropilică; 4. 2,6-di-*tert*-butil-4-metilfenol; 5. β-Naftol; 6. Acid cresilic; 7. 4-*Tert*-butilcatechol TEL a fost adăugat în toate cazurile 3 ml/gallon. După Walters [85].

tuită de urmele de cupru provenite din ţevi şi bazine şi care se combate cu antioxidanţi derivaţi din aldehidă salicilică sau din *N*-butilaminofenol [84].

Combustibilii pentru propulsie (jet). Reziduul, admis pînă la 50 mg/dl, are o compoziţie mai variată ca benzinele, predominînd compuşi azotaţi de tipul anilinei şi piridinei. Prezenţa ionilor de cupru în concentraţie de 0,01—10 p.p.m. creşte considerabil peroxidarea. Se folosesc antioxidanţi de tipul 2,4-dimetil-6-*tert*-butilfenolului (Topanol) sau derivaţi ai salicil aldehidei ca *N*,*N*′-disalicilol-1,2-propandiimina.

Combustibilul pentru motoarele Diesel are susceptibilitatea cea mai mare la autooxidare producînd rezidii solubile şi insolubile formate din diene alifatice, olefine aromatice, tiofeni, polisulfuri şi mercaptani.

Datorită variatelor structuri ale substanţelor din produsele petrolifere implicate în peroxidare, mecanismele ce duc la formarea rezidiilor sînt dificil de studiat. Mayo [55] a iniţiat o serie de cercetări centrate pe diene conjugate ce formează destul de uşor peroxizi polimerizaţi sau radicali alchilperoxi ce servesc la propagarea peroxidării şi producerea formelor polimerizate (fig. 6.2. A). Un alt mecanism porneşte de la tiofenoli, care prin autooxidare în acizi sulfonici vor cataliza peroxidarea olefinelor, după care ar urma o secvenţă de reacţii ce includ descompunerea hidroperoxizilor în aldehide, peroxidarea acestora în peroxihemiacetali, descompunerea lor în esteri cu greutate moleculară mai mare datorită condensării (fig. 6.2. B). Oricare ar fi mecanismele implicate în peroxidarea produselor petrolifere şi formarea consecutivă a rezidiilor cu consecinţe nedorite,

Scanned with OKEN Scanner

folosirea în scop protector a antioxidanţilor necesită adăugarea mai multor substanţe care acţionează prin mecanisme diferite, sinergic, [61, 84].

Lubrifianţi. Datorită complexităţii aparaturii moderne, lubrifianţii trebuie să facă faţă unor cerinţe calitative crescînde. În 1956 s-au vîndut în Statele Unite 600 milioane galoane lubrifianţi conţinînd 73 milioane galoane de antioxidanţi [74]. Aceasta indică utilitatea adăugării unor amestecuri sinergice de antioxidanţi pentru a face faţă condiţiilor diferite

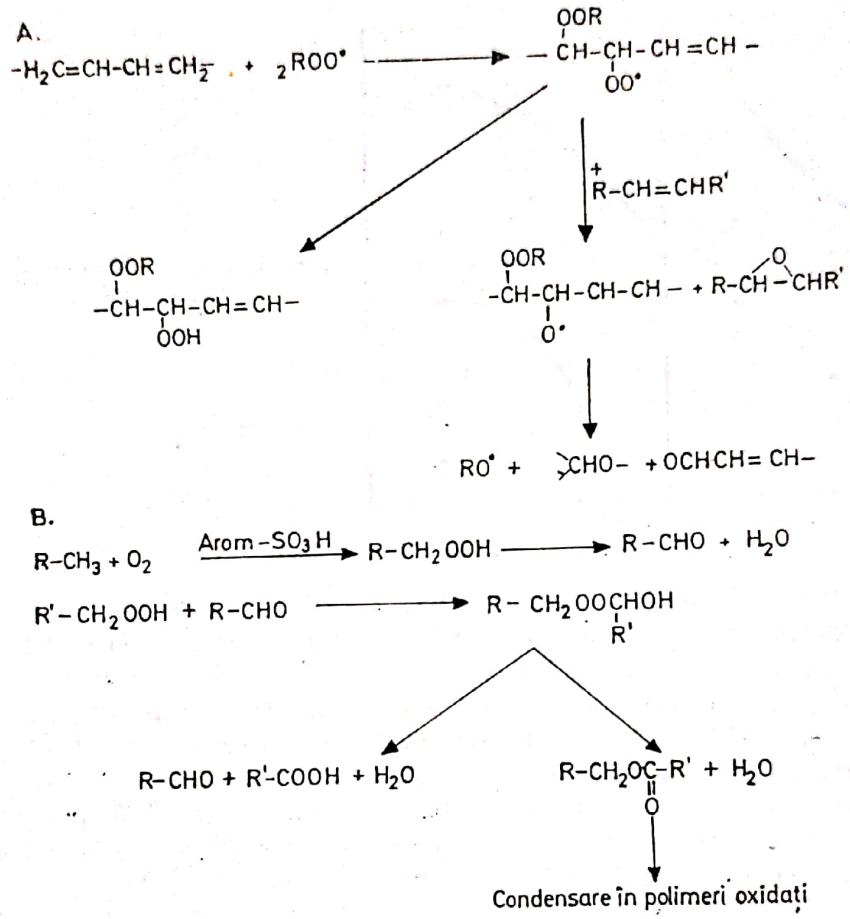


Fig. 6.2. Mecanisme de producere a peroxizilor polimerizaţi în combustibili. A. prin sisteme dien şi radicali alchilperoxi; B. prin acţiunea catalitică a acizilor sulfonici. După Mayo [55] şi Scott [74].

de utilizare ale lubrifianţilor. Prezenţa lubrifianţilor în maşini ce funcţionează la temperaturi ridicate, cu mişcări violente ce împrăştie uleiul pe suprafeţe metalice fierbinţi constituie condiţii favorabile producerii gazelor „*blow-by*" ce ies din pistoane şi sînt formate din peroxizi, acizi organici, aldehide, acizi sulfonici. Uleiurile lubrifiante constituie un amestec extrem de complex de hidrocarburi şi alte substanţe organice cu mase moleculare variind între 300—800. Hidrocarburile componente includ cicloparafine alchilate (naftene) şi aromatice alchilate sau cicloalchilate [12]. Efectele peroxidării asupra uleiurilor lubrifiante constau în coroziune, un miros specific şi formarea rezidiilor. Aceste efecte se datoresc peroxizilor, produşilor de descompunere cum sînt aldehidele şi acizii, cît şi formelor polimerizate cu aspect variat.

Scanned with OKEN Scanner

Studierea unor modele mai simple sau a curbelor de oxidare (fig. 6.3.) din perioada de inițiere nu au permis obținerea unor informații mai detaliate datorită complexității extreme în compoziția lubrifianților. Chiar și pentru compuși foarte înrudiți cum sînt naftalenul și metilnaftalenul se obțin curbe de oxidare diferite. Tipul de curbă A (fig. 6.3) a fost obținut pe hidrocarburi cu structuri variate ca *n*-decan, cetan, diciclohexil, perhidroantracen, *n*-amilciclohexan.

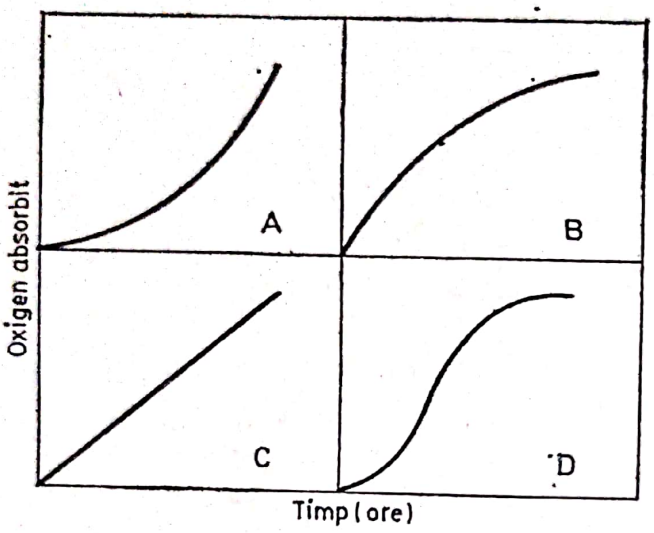


Fig. 6.3. Curbe de oxidare tipice ale hidrocarburilor [74].

Necesitățile industriale au impus studiul autooxidării uleiurilor pe suprafețe metalice ce au arătat [87] că ionii metalici (Fe, Cu, Pb, Cd) constituie agenți prooxidanți foarte eficienți. Așa cum s-a arătat în capitolul 3, ionii metalici acționează ca inițiatori ai lanțului autooxidativ. Uleiurile lubrifiante conțin cantități relativ mari de fier în momentul cînd începe coroziunea și crește viscozitatea. Dar și în acest caz complexitatea compoziției lubrifianților produce variații mari datorită prezenței unor componente neidentificate care probabil prin complexarea ionului metalic mărește perioada de inducție și deci stabilitatea.

Pe de altă parte lubrifianții nerafinați sînt mai rezistenți la peroxidare datorită prezenței unor compuși conținînd sulf cu caracter antioxidant. Acest efect modifică eficiența antioxidanților sintetici adăugați. Denison [19] și Scott [74] au elaborat un mecanism după care antioxidanții naturali din uleiuri acționează prin descompunerea peroxizilor și vor interfera cu antioxidanți ce întrerup lanțul oxidativ.

Antioxidanții folosiți pentru protejarea lubrifianților trebuie să fie multifuncționali (antioxidant, anticoroziv, antișoc). Compuși organometalici, cum este tetraetil plumbul, constituie cei mai eficienți agenți antișoc, dar și antioxidanți moderați. Dar în anumite condiții ei pot genera radicali liberi datorită unei disocieri de tipul:

$$Pb(Etil)_4 \rightleftharpoons Pb(Etil)_3 + Etil\cdot$$

Pentru turbine, motoare cu propulsie ce lucrează la temperaturi mari se folosesc lubrifianți și antioxidanți speciali. La fel în centralele

atomoelectrice, unde prezenţa radiaţiilor ionizante accelerează viteza de autooxidare a uleiurilor. Coroziunea lubrifianţilor se datoreşte acizilor organici formaţi prin descompunerea peroxizilor (fig. 6.4) şi se combate atît prin inhibarea peroxidării, cît şi prin reducerea acizilor.

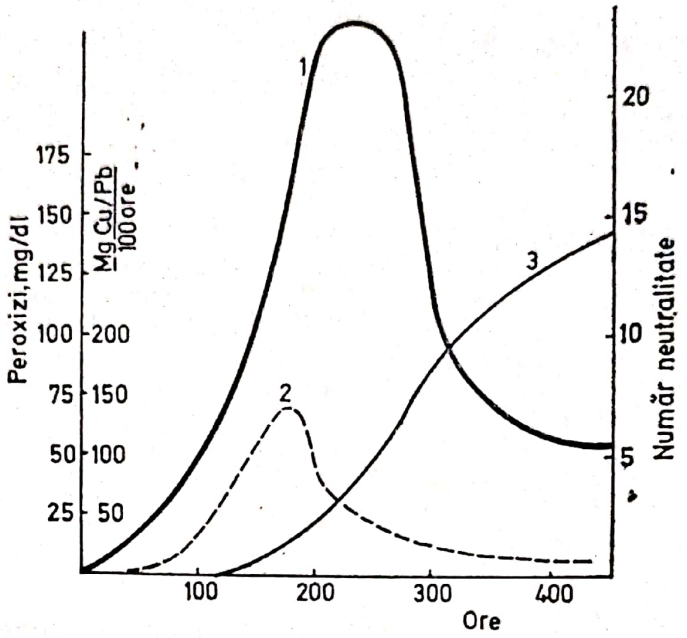


Fig. 6.4. Dependenţa coroziunii de concentraţia în peroxizi. 1. Peroxizi ; 2. Viteza relativă a coroziunii ; 3. Număr de neutralizare [19].

6.2. POLIMERI

Deşi există numeroase diferenţe în proprietăţi fizice şi structuri chimice între polimerii sintetici, totuşi formarea hidroperoxizilor se produce destul de uşor, după mecanisme asemănătoare. Principalele consecinţe ale peroxidării sînt următoarele :

— sciziunea lanţului sau catenei la nivelul legăturii carbon-carbon datorită radicalului alcoxi. Deşi prezent la toţi polimerii, acest efect predomină la polietilenă, polipropilenă şi mai puţin la nylon şi terilenă.

— formarea unor structuri olefinice sau de grupări carbonil datorită eliminării unor grupări funcţionale. Acest efect predomină la polimeri conţinînd clor (PVC) şi în unele hidrocarburi la temperaturi mari.

— formarea unor ramificări *(cross-linking)* datorită reacţiilor de adiţie a radicalilor alcoxi. Ramificarea se produce mai ales în ultimile stadii ale autooxidării polimerilor şi modifică proprietăţile fizice.

Desigur sensibilitatea polimerilor la autooxidare depinde de structura lor chimică, în special conţinutul în legături duble 1,3 şi 1,4. Studiul absorbţiei O_2 [51] a arătat o scădere a sensibilităţii la peroxidare în ordinea alcool polivinilic <PVC < nylon < polimetacrilat < polistiren. Prin structura sa, polistirenul (fig. 6.5. A) conţine gruparea α, α'-dialchilbenzil asemănătoare cumenului şi ar fi trebuit să fie mai oxidabilă decît polipropilena (fig. 5.5. B) sau polietilena. Se pare că structura tridimensio-

nală a lanţurilor determină rezistenţa polistirenului. Etapa de eliminare a unui atom de hidrogen (Capitolul 2) ce iniţiază lanţul autooxidativ este determinată de stabilitatea radicalului aralchil, iar acesta depinde de interacţia electronului impar al radicalului liber (fig. 6.3 C) cu electronii π ai ciclului benzenic. Această interacţie este maximă cînd atomii β-C

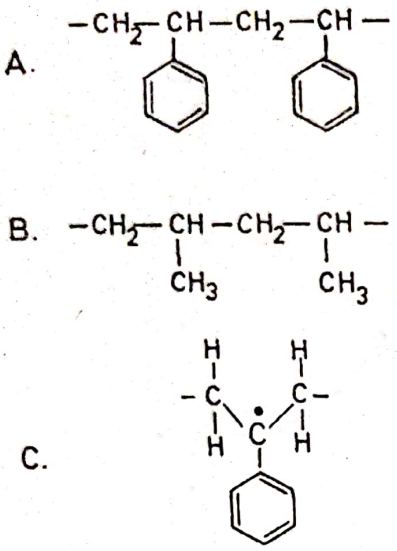


Fig. 6.5. Structura catenei unor polimeri: A. Polistiren; B. Polipropilenă; C. Structura radicalului liber aromatic din polistiren.

ai substituenţilor alchil sînt în acelaşi plan cu ciclul benzenic. În soluţie, gruparea fenil este capabilă de rotaţie şi polistirenul se oxidează mai uşor decît în stare solidă [57]. Introducerea în cursul polimerizării a grupărilor termolabile peroxi sau carbonil reduce mult rezistenţa la peroxidare, acelaşi efect fiind dat şi de impurităţi metalice.

6.2.1. POLIOLEFINE

Dezvoltarea plasticelor pe bază de polietilenă sau polipropilenă este frînată de instabilitatea lor. Dacă antioxidanţii convenţionali (di-aril-*p*-fenilendiamină) acţionează eficient pentru temperaturi mari, în schimb marea sensibilitate a acestor polimeri faţă de lumină este greu de protejat. În cazul aceluiaşi polimer, o microstructură amorfă sau o structură chimică mult ramificată măreşte fotosensibilitatea [34]. Peroxidarea poliolefinelor poate fi urmărită prin absorbţia în infraroşu datorită benzilor de la 2,81 şi 2,97μ corespunzînd hidroperoxizilor nelegaţi şi legaţi. În continuare apar produşi conţinînd gruparea carbonil (cetone). După cum arată fig. 6.6.A, odată cu descompunerea hidroperoxizilor va fi o competiţie între formarea cetonelor fără sciziunea lanţurilor şi formarea aldehidelor cu sciziune [4]. Odată cu descompunerea peroxizilor benzile de absorbţie se complică datorită suprapunerii unor produşi şi a unor succesiuni de reacţii. Apar astfel benzi la 5,75μ (grupări ester), 5,812μ (cetone), 8—8,5μ (ramificări) etc. Sciziunea lanţurilor poate fi influenţată prin variaţia temperaturii şi a prezenţei antioxidanţilor, aşa cum rezultă din fig. 6.6.B. Fotosensibilitatea poliolefinelor se datoreşte grupărilor carbonil [48], dar prezenţa ionilor metalici şi a ozonului măresc şi mai mult efectul per-

Scanned with OKEN Scanner

oxidant. Ozonul pare să acţioneze după schema prezentată în fig. 6.6.C, prin eliminare de hidrogen şi producere de radicali liberi.

Polietilena este mai uşor de protejat decît propilena prin antioxidanţi fenolici, la temperaturi mari. Protecţia contra acţiunii luminii se realizează mai greu folosind amestecuri sinergice de antioxidanţi fenolici cu tioli (tio-β-naftol) sau sulfuri (dilauriltiodipropionat) [48].

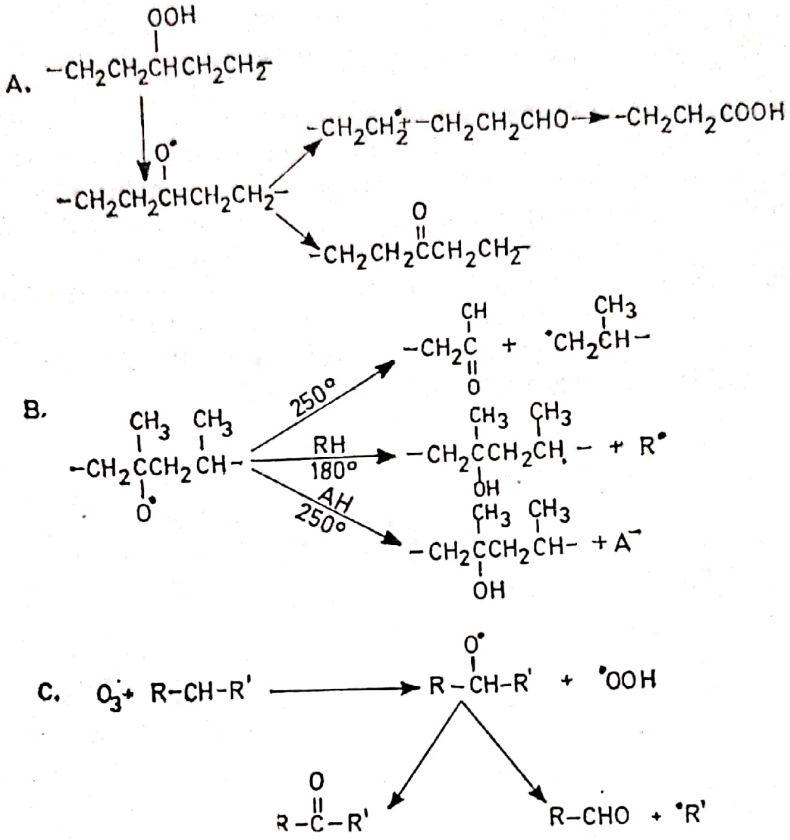


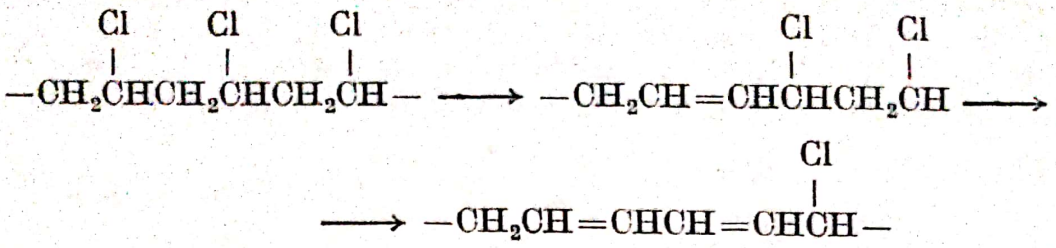
Fig. 6.6. Mecanisme de descompunere a hidroperoxizilor în polimeri. A. Competiţia între sciziunea lanţului şi formarea aldehidelor. B. Degradarea propilenei la diferite temperaturi şi în prezenţa unor reducători (RH) şi antioxidanţi (AH) C. Degradarea polimerilor sub acţiunea ozonului.

Cunoaşterea proceselor ce au loc în cursul peroxidării a permis nu numai protejarea polimerilor, dar şi adăugarea unor peroxizi cum sînt cei derivaţi din cumil [45, 58] sau butil [38] pentru modificarea calităţilor polimerilor în anumite direcţii, cum sînt creşterea elasticităţii [14] sau adezivitatea de suprafeţe metalice [1].

6.2.2. POLICLORURA DE VINIL (PVC)

Se degradează în contact cu atmosfera mai ales la temperaturi ridicate (180°C), înnegrindu-se, eliberînd acid clorhidric şi pierzîndu-şi unele proprietăţi (crăpături, pierderea constantei dielectrice). La temperaturi normale deteriorarea PVC se datoreşte reacţiilor fotosensibilizante datorită unor impurităţi cetonice.

Mecanismul degradării PVC cuprinde în primul rînd eliminarea HCl din polimer și formarea unui sistem de duble legături conjugate de forma



Prin această reacție se creează substraturi favorabile peroxidării (sisteme dien conjugate), iar pe de altă parte HCl solubilizează metalele oferind o altă sursă de agenți prooxidanți. Această primă reacție are loc în cursul fabricării polimerilor la temperaturi ridicate, unde peroxizii au fost detectați [54], după care peroxidarea decurge după unele mecanisme prezentate în fig. 6.7. A și B. Se observă după aceste scheme formarea în continuare a unor produși de degradare a peroxizilor (aldehide și cetone) ce constituie centrii de absorbție a radiațiilor UV (270—280 nm) și de continuare a peroxidării la temperaturi normale.

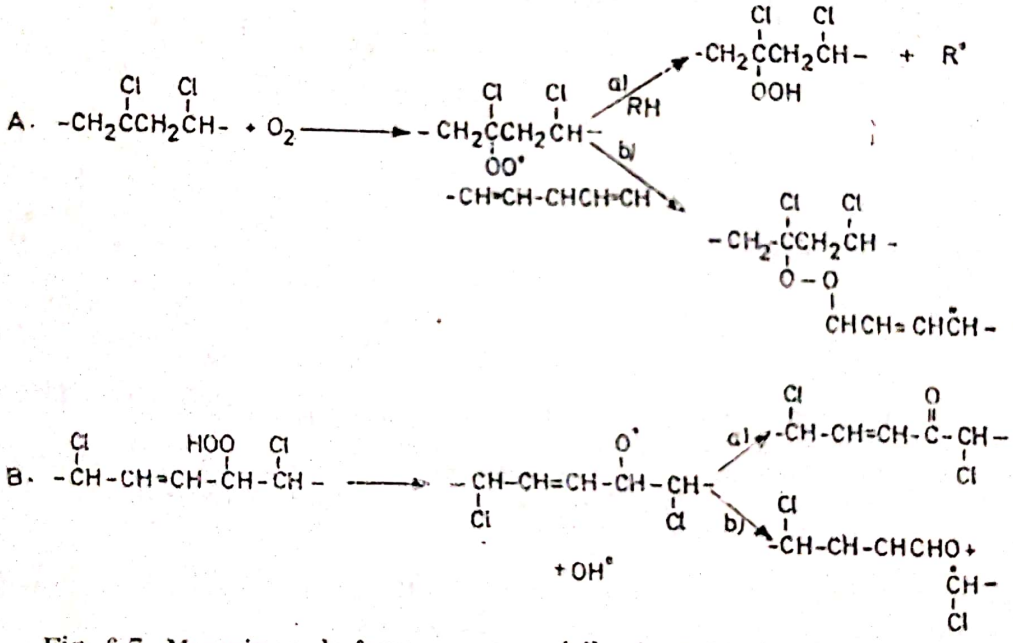


Fig. 6.7. Mecanisme de formare a peroxizilor în PVC. După [54, 74]. A. Formarea hidroperoxizilor, apoi competiția dintre sciziunea lanțului (a) și ramificarea (b). B. Formarea compușilor carbonili conjugați.

Sistemele de protejare a PVC descrise în diferite patente cuprind o sare solubilă a unui metal (laurați de Ba sau Cd), un compus bazic pentru neutralizarea HCl, un deactivator al UV (hidroxibenzofenonă) și o substanță ce activează descompunerea peroxizilor (fosfiți) [51, 74].

Pe de altă parte, prin cunoașterea proceselor de degradare, adăugarea în condiții controlate de peroxizi poate orienta polimerizarea în direcția dorită. De exemplu ramificarea PVC prin dialil ftalat și dicumil peroxid crește tăria mecanică [3].

Scanned with OKEN Scanner

6.2.3 CELULOZĂ

Este un material relativ stabil, dar derivaţii săi (esteri şi eteri) sînt mult mai susceptibili mai ales la acţiunea UV. Ca şi în cazul PVC, peroxizii sau cetonele introduse în polimeri în cursul fabricării constituie centri de peroxidare. După cum se observă în fig. 6.8, chiar la 90° se produc transformări chimice în etil celuloză în sensul scăderii conţinutului în grupări etoxi şi creşterii formării peroxizilor şi a compuşilor carbonil rezultaţi din descompunerea lor.

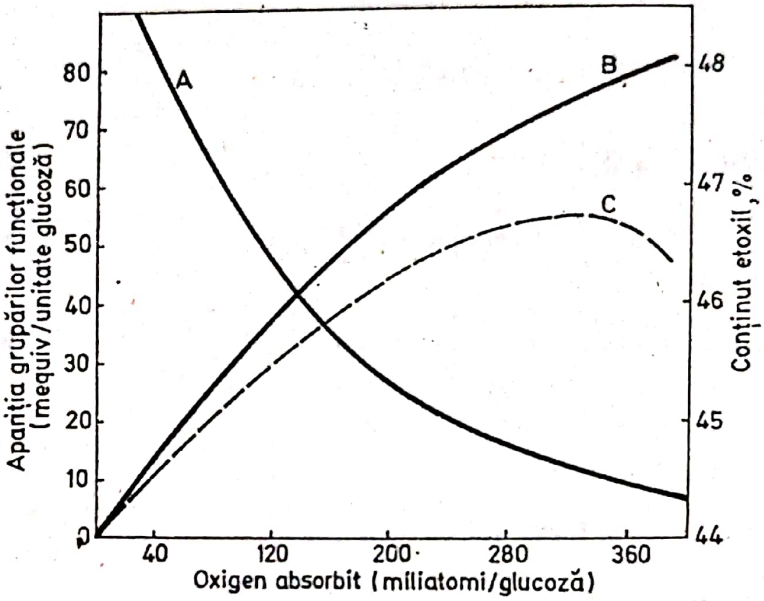


Fig. 6.8. Modificări chimice în timpul autooxidării etilcelulozei la 90°C. A. Conţinut etoxil; B. Formarea compuşilor carbonil; C. Formarea peroxizilor. După Evans [28].

Degradarea fotosensibilizantă a celulozei şi derivaţilor decurge asemănător cu cea termică. Conţinutul în peroxizi al celulozei este mai mare în prezenţa radiaţiilor UV [28] în jur de 330 nm. Energia radiaţiilor UV este suficientă pentru ruperea legăturilor C—C sau C—O. Coloranţii folosiţi în cernelurile hîrtiei tipărite pot acţiona drept fotosensibilizatori, producînd în primul rînd H_2O_2 [25]. Oxizii de Zn şi Ti folosiţi în industria textilă absorb puternic radiaţiile UV şi produc în combinaţie cu coloranţi peroxizi de tipul H_2O_2. Coloranţii cu structură antrachinoidă galbenă şi portocalie sînt cei mai sensibili. Mecanismul de reacţie necesită prezenţa unei umidităţi mari şi implică oxidarea ionilor hidroxil de către colorantul excitat şi formare de peroxizi

$$D\cdot + OH^- \longrightarrow D^- + OH\cdot$$

$$D^- + H^+ + O_2 \longrightarrow D + HOO\cdot \xrightarrow{RH} HOOH + R\cdot \xrightarrow{O_2} ROO\cdot$$

Antioxidanţii folosiţi în amestecuri sinergice cuprind fenoli (tio-β-naftol), sulfuri (di-*p*-nitrofenil disulfură), deactivatori UV (2,4-dihidroxibenzofenonă).

Pe de altă parte, H_2O_2 în combinație cu silicați alcalini constituie un tratament eficient al albirii lignocelulozei [37].

6.2.4. POLIAMIDE ȘI POLIURETANI

Constituie o clasă de polimeri caracterizați printr-un conținut ridicat în grupări carbonil, o rezistență apreciabilă la degradarea termică, dar o mare sensibilitate la UV. Principalele tipuri de polimeri din aceste clase sînt prezentate în fig. 6.9.

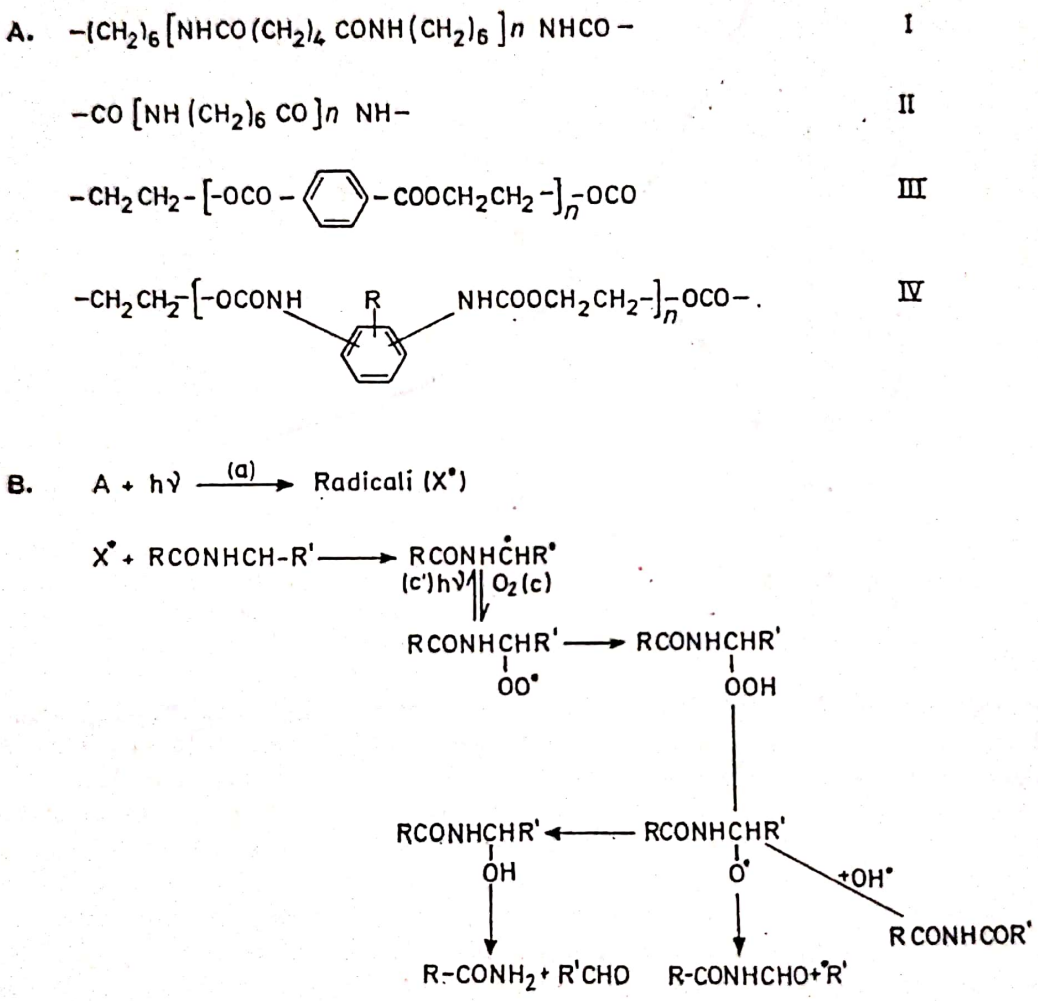


Fig. 6.9. A. Principalii polimeri conținînd gruparea carbonil. I = Nylon, II = Policaproamidă, III = Polietilen tereftalat (Terilenă), IV = Poliuretani. B. Mecanismul degradării fotosensibilizante a polimerilor conținînd gruparea carbonil (A). După Scott [74].

Substratul peroxidabil este constituit din partea comună $RCONHCH_2R'$ din structura acestor polimeri. Mecanismul descris [50] în fig. 6.9. B pornește de la o grupare cromofor A (impurități sau o structură favorabilă absorbției UV) și explică producerea în final a hexanamidei și acidului hexanoic în cazul nylonului [83].

Scanned with OKEN Scanner

Din grupa poliuretanilor, eterii sînt cei mai autooxidabili avînd un conţinut ridicat în peroxizi chiar la temperaturi normale [49]. Elastomerii poliuretani se caracterizează printr-o fotodeteriorare rapidă. Amestecurile sinergice de antioxidanţi cuprind metal fosfaţi, fenotiazine, ditiocarbamaţi etc., pentru a proteja contra peroxidării, dar şi pentru a păstra calităţile fizice necesare [49, 74]. Astfel peroxizii pot fi folosiţi pentru întărirea poliesterilor nesaturaţi [46].

6.2.5. PEROXIZI CA AGENŢI AI POLIMERIZĂRII ŞI RAMIFICĂRII

În ultimii ani au apărut multe patente în care peroxizi ca dicumil sau butil-peroxi sînt folosiţi ca iniţiatori ai polimerizării sau ramificării polimerilor cu structuri variate. Menţionăm astfel H_2O_2 50% + anhidridă propionică [53], di-*tert*-butil peroxidicarbonat pentru polimerizarea stirenului [42], etilenei [39], metacrilatului conţinînd grupări epoxi (57). Acest peroxid trebuie manipulat cu atenţie faţă de lumină deoarece dă uşor prin descompunere fotolitică mai mulţi radicali iniţiatori ai peroxidării conform reacţiilor de mai jos [68]:

$$t\text{-BuOOH} \xrightarrow{h\nu} t\text{-BuO}\cdot + \text{OH}\cdot$$

$$t\text{-BuOOH} + \text{RO}\cdot \longrightarrow t\text{-BuOO}\cdot + \text{ROH}$$

Dicumil peroxidul este folosit de asemenea ca agent de ramificare [30], dar mai ales pentru creşterea adezivităţii poliolefinelor de suprafeţe metalice [1] sau a polietilenei [73].

Prezenţa peroxizilor şi controlul peroxidării atît prin procedee fizice, cît şi prin antioxidanţii adăugaţi într-o etapă ulterioară permite folosirea acestora în direcţii dorite. Peroxizii modifică proprietăţile cinetice ale polimerilor, creează un volum liber în interiorul lanţurilor, permiţînd acestora o libertate de mişcare fără schimbarea stării de agregare [73]. Creşterea conţinutului în peroxizi măreşte rezistenţa la întindere şi scade gradul de formării prin presiune [38].

Acţiunea de iniţiere exercitată de peroxizi în polimerizarea sau ramificarea polimerilor depinde mult de natura acestora. Descompunerea dicumil peroxidului la 200° este o reacţie de ordinul întîi ce dezvoltă o energie de activare de $8{,}3 \cdot 10^4$ kcal/mol, suficientă de a iniţia noi reacţii prin radicali liberi, cu efecte nedorite.

6.2.6. ACŢIUNEA RADIAŢIILOR IONIZANTE ASUPRA POLIMERILOR

Modificarea proprietăţilor polimerilor prin expunere la acţiunea radiaţiilor ionizante a devenit un procedeu obişnuit. Energia termică produce ruptura unor legături slabe din polimeri formînd astfel radicali liberi. Radiaţiile UV sînt absorbite selectiv de anumite structuri moleculare producînd sciziunea unor legături. Radiaţiile ionizante sînt absorbite în funcţie de energia lor şi de densitatea electronilor pe parcurs. Polimerii formaţi din hidrocarburi sînt transparenţi la radiaţii deoarece au nuclee

Scanned with OKEN Scanner

mici din C și H. După terminarea iradierii și a transferului de energie procesul oxidativ decurge termic sau fotoinductiv rezultînd ramificări sau degradarea polimerului. Iradierea polimerilor creează deci condiții formării hidroperoxizilor care desăvîrșesc procesul de autooxidare [51].

Procesul este autocatalitic numai dacă hidroperoxizii formați prin iradiere au un randament G mai mare decît cel obținut termic. În general radiațiile gamma și X de 75 kV prin acțiune asupra hidrocarburilor produc aceiași produși finali ca și autooxidarea termică. Prin iradiere controlată se imprimă polimerilor proprietăți fizico-chimice dorite, în special creșterea punctului de topire, scăderea elasticității, a solubilității. În general radiațiile ionizante creează punți intercatenare sau puncte de legătură unde se pot grupa copolimeri [2, 13, 44]. Principalele modificări induse de radiații ionizante asupra polimerilor sînt:

a) Sciziunea lanțului central ce va duce la o scădere a masei moleculare și o polidispersie în părți neuniforme.

b) Ramificări sau reticulări intra- sau intermoleculare producînd o rețea largă, de multe ori insolubilă și rigidă (fig. 6.10.)

c) Ruperea structurilor secundare ale macromoleculei mai ales în proteine.

d) Degradarea, mai ales în soluții apoase, datorită sciziunilor legăturilor chimice; aproximativ o sciziune pentru 60 eV energie radiantă [2].

Asocierea iradierii cu căldura produce formarea unor cantități apreciabile de monomer datorită sciziunilor. În acest caz se formează aproximativ $2 \cdot 10^{-5}$ moli radicali liberi per litru polimer [51], cantitate suficientă pentru a produce peroxizi și prin descompunerea acestora a unei largi

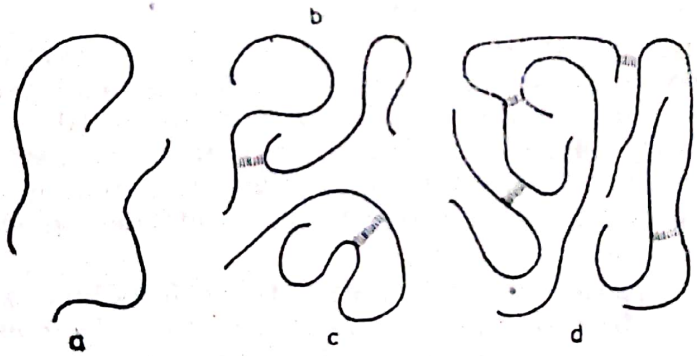


Fig. 6.10. Ramificarea *(cross-linking)* a unei molecule de polimer flexibil a) înaintea reacției, b) intermolecular, c) intramolecular, d) formarea unei rețele de gel insolubil sau rigide.

game de produși printre care CO_2, CO, ce vor determina o expansiune a volumului polimerului. Combinarea iradierii cu temperaturi mai ridicate permite producerea unor modificări în sensuri diferite, cum ar fi polimerizare și depolimerizare, ramificare, grefări de alți compuși.

Totuși natura polimerilor limitează mult aceste procedee. Astfel la poliizobutilenă, polimetilstiren, polimetacrilonitril, celuloză și derivați, copolimeri, predomină procesele de degradare în urma iradierii, dar la polietilenă, polistiren, polivinil, poliacrilamidă, polibutadienă, policloropren, poliamidă, siloxani vor predomina ramificările.

Scanned with OKEN Scanner

Recent s-a găsit o relaţie între randamentul hidroperoxizilor produşi prin iradierea polipropilenei la temperaturi joase şi presiunea O_2 [67]. Relaţia este liniară pînă la o presiune de 600 torr, iar degradarea peroxizilor se produce prin izomerizarea radicalilor hidroperoxialchil. Asocierea iradierii polimerilor cu fotoliza permite evitarea temperaturilor ridicate [78], deoarece cele două acţiuni dau efecte aditive.

6.3. CAUCIUCUL

Cauciucul suferă de asemenea efectul nociv al peroxidării şi rezolvarea acestei probleme a permis dezvoltarea industriei respective. Cauciucul natural, *cis*-1,4-poliizopren, absoarbe O_2 încă în fază de latex, dar nu ridică probleme practice datorită prezenţei antioxidanţilor naturali.

În timpul prelucrării, cauciucul este supus unor temperaturi ridicate şi unor acţiuni mecanice pentru scăderea viscozităţii prin ruperea lanţurilor. Acest tratament foloseşte peroxidarea apelînd chiar la prooxidanţi de tipul ionilor metalici şi în unele privinţe seamănă cu autooxidarea olefinelor, dar este mult mai rapidă. Caracteristic peroxidării cauciucului natural este schimbarea spectaculară a proprietăţilor fizice, ţinînd seama că pentru o cantitate mică de O_2 cu o masă de 32 se produc modificări profunde într-un polimer cu masă de milioane. Acest înalt randament se explică prin însumarea efectelor acţiunilor termice, mecanice şi fotosensibilizante care conduc sinergic la formarea hidroperoxizilor intermediari detectaţi de-abia în 1949 de Bolland şi Hughes [11]. Produşii finali ai autooxidării sînt CO, CO_2 şi acizi carboxilici de tipul formic, acetic şi levulenic, ce provin din descompunerea peroxizilor [6, 74]. Bevilacqua [6] a propus un mecanism ce presupune formarea unor peroxizi ciclici prin mecanism clasic de eliminare a unui atom de H şi absorbţie de O_2, urmată de descompunerea lor şi producerea unei grupări carbonil pe o sciziune de lanţ. Datele experimentale nu confirmă acest mecanism şi nici cele ulterioare. O imagine a evoluţiei diferitelor grupări chimice implicate în autooxidarea cauciucului natural este sugerată de fig. 6.11. A, în care se observă scăderea peroxizilor şi grupărilor carbonil. Comparativ este trecută (fig. 6.11. B) comportarea tipică a polimerilor dienici la absorbţia O_2.

Reducerea masei moleculare a cauciucului este o primă etapă premergătoare diverselor tratamente şi se realizează fizic (măcinare) şi chimic prin folosirea unor catalizatori ai autooxidării (complecşi ai unor ioni metalici, ca nichel di-izopropilditiofosfat) sau generatori de radicali liberi care conţin tioli (*tert*-butil-SH, mercaptobenzen, mercaptonaftalen, tiouree). În general sînt folosiţi tiolii care cu radicalii peroxi produc radicalul tiil (RS·), conform reacţiilor:

$$RSH + ROOH \rightarrow RS\cdot + RO\cdot + H_2O$$

$$RSH + O_2 \rightarrow RS\cdot + \cdot OOH$$

Radicalul tiil pare să deactiveze radicalii existenţi în polimer, deoarece tiolii care i-au generat sînt strîns legaţi de cauciuc şi cantitatea lor creşte odată cu scăderea masei moleculare [22]. Adăugarea tiolilor ca plastifianţi în timpul măcinării cauciucului măreşte rezistenţa la îmbătrînire. Deoarece

Scanned with OKEN Scanner

plastifianţii sau peptizanţii sînt prooxidanţi prin promovarea lanţului autooxidativ, eficienţa lor depinde de labilitatea atomilor de hidrogen alilici prezenţi în cauciuc (Capitolul 3.1.). Activitatea acestor plastifianţi scade în ordinea cauciuc > poliizopren > polibutadienă > polistiren > > policloropren > nitril-cauciuc, reflectînd de fapt uşurinţa la oxidare. În afară de tioli, ca plastifianţi mai pot fi folosiţi ceto-enoli, unii fenoli, aciloine, hidrazine, acizi sulfinici, avînd caracteristic un potenţial redox

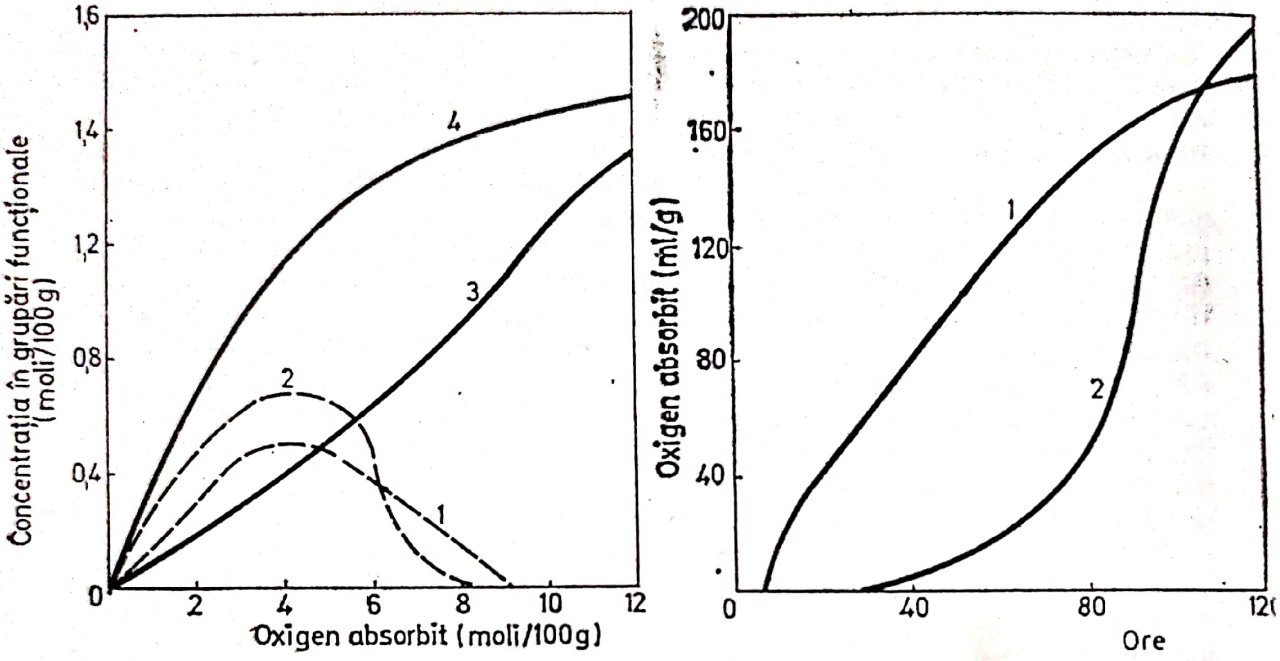


Fig. 6.11. Autooxidarea în cauciuc. A. Formarea unor grupări chimice în funcţie de O_2 absorbit în timpul autooxidării 1-fenil-penten la 80°C. 1) peroxid, 2) carbonil, 3) ester, 4) carbonil + ester B. Curbe tipice de absorbţie ale O_2 de către polimeri dienici. 1) cauciuc natural, 2) emulsie de polibutadienă la 50°C. După [7].

mic şi o mare afinitate de combinare cu peroxizi. Unii din aceşti compuşi, cum este fenilhidrazina, se oxidează uşor producînd H_2O_2; apoi în continuare radicalul hidroxil [74]

$$\Phi NH-NH\Phi \xrightarrow{O_2} \Phi N-N\Phi + H_2O_2$$

$$\Phi NH-NH\Phi + H_2O_2 \longrightarrow \Phi\dot{N}NH\Phi + HO\cdot + H_2O$$

O altă caracteristică a cauciucului natural este comportarea diferită a antioxidanţilor. Astfel, fenil-β-naftilamină, un antioxidant puternic, acţionează la concentraţii mici ca un prooxidant, crescînd absorbţia O_2 şi formarea unei cruste la suprafaţă. De-abia la o concentraţie mare, de 10%, acest antioxidant protejează contra peroxidării termice, dar nu şi faţă de acţiunea UV. Antioxidanţii mai utilizaţi aparţin grupei ditiocarbamaţilor sau a deactivatorilor de ioni metalici (etilendiamine) [47].

Scanned with OKEN Scanner

6.3.1. CAUCIUCUL SINTETIC

Este mai rezistent la peroxidare decît cel natural. La presiuni joase de O_2, în absenţa antioxidanţilor, cauciucul sintetic se oxidează rapid termic devenind insolubil şi crescîndu-i viscozitatea. Creşterea viscozităţii este deosebită de „rezinificarea" cauciucului natural, asemănîndu-se mai mult cu uleiurile sicative. Se produc atît sciziuni, cît şi ramificări, iar analiza produşilor finali a arătat un număr mare de duble legături, acid formic şi formaldehidă [47]. Mecanismele formării hidroperoxizilor încă nu satisfac datele experimentale şi mai ales sensibilitatea la acţiunea UV [7, 26].

6.3.2. CAUCIUCUL VULCANIZAT

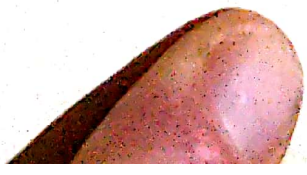
Este foarte rezistent la acţiunea O_2 la temperaturi normale. În schimb la temperaturi ridicate şi în prezenţa radiaţiilor UV adăugarea antioxidanţilor devine necesară.

În cursul vulcanizării se produc o serie de modificări în cauciuc asemănătoare autooxidării în sensul creşterii gradului de ramificare astfel că viteza de oxidare depinde de cantitatea de sulf combinată [41]. În al doilea rînd, atît pentru calităţile cauciucului, cît şi pentru rezistenţa la oxidare contează tipul ramificării realizate prin vulcanizare. Astfel, paradoxal, cele mai rezistente forme de cauciuc vulcanizat la oxidare sînt cele pretratate prin iradiere în vid sau la presiune mărită de O_2 sau chiar cu peroxizi adăugaţi [35, 56, 63, 66].

În cauciucul vulcanizat apare un nou fenomen, relaxarea faţă de stress, datorită rezistenţei noilor legături. Această calitate poate fi folosită la testarea eficienţei unor variante ale vulcanizării sau ale rezistenţei la oxidare. Astfel, cauciucul tratat cu disulfură de tetrametiltiuram (TMT) este la fel de rezistent ca cel ce conţine antioxidanţi, iar vulcanizarea fără sulf este mai eficientă din acest punct de vedere decît cea cu sulf. Această comportare rezultă şi prin curbele de absorbţie a O_2. Mecanismele propuse pentru a explica aceste efecte nu satisfac datele experimentale, cu atît mai mult cu cît nici structura cauciucului vulcanizat nu este cunoscută în detaliu [44]. De asemenea nici rolul important al O_2 în timpul vulcanizării nu este explicat satisfăcător. În plus, prezenţa unor antioxidanţi acceleratori nu produce efecte aditive, iar stabilirea unor domenii de concentraţie optimă este absolut necesară. Din lipsa unor mecanisme satisfăcătoare abundă soluţiile empirice prin abundenţa patentelor ce propun noi ameliorări bazate pe amestecuri de antioxidanţi [21, 26, 31, 60].

În afara polimerizării, peroxizii mai sînt folosiţi în mărirea adezivităţii cauciucului la polietilenă [15], la poliesteri [59] sau la fabricarea cauciucului siliconat [10, 33, 70, 76].

Nici un alt polimer nu este atît de influenţat de peroxidare precum este cauciucul, atît prin tratamente, cît şi prin „îmbătrînire". Producerea unor sciziuni, cît şi a unor ramificări au efecte dramatice asupra proprietăţilor fizice ale cauciucului [76], prin „activarea" sau mărirea posibilităţilor de reacţie ale lanţurilor polimerului.



Scanned with OKEN Scanner

6.4. GRĂSIMI ȘI ULEIURI

Aceste produse de structură olefinică variază foarte mult în oxidabilitate datorită diverselor grade de nesaturare, cît și aranjamentelor sterice favorabile. Peroxidarea constituie cauza majoră a deteriorării (rîncezirii) grăsimilor și uleiurilor. După cum s-a arătat în capitolul 3, aceste produse constituie substratul cel mai favorabil peroxidării, drept care a fost și cel mai mult studiat. Ținînd seama de tratarea acestui subiect în capitolul 3.1. vom expune doar pe scurt secvența modificărilor, rezumate dealtfel în tabelul 6.1.

Tabelul 6.1.

Procese implicate în alterarea grăsimilor

Alterarea	Natura agentului	Alterarea gustului	Suport	Reacții analitice
Rîncezirea hidrolitică	Ioni H^+, OH^- Căldură	Butirică Săpunuri	Acizi grași cu greutate moleculară mică și medie	Indice de reactivitate Indice de aciditate
Rîncezirea oxidativă. Peroxidare Sciziuni	Aer, O_2 Căldură Lumină Ioni metalici Lipoxidaze	Imperceptibilă în prima perioadă apoi rîncezire și acidulare	Aldehide Acid formic Peroxizi Polimeri	Indice Lee Indice de peroxidare Determinare peroxizi Indice carbonil Dozare oxiacizi
Rîncezire biochimică. Autooxidarea acizilor grași nesaturați	Mucegaiuri Bacterii	Aldehide și acizi volatili	Metilcetone	Identificare colonii Reacția Taufel-Thaler

Distrugerea antioxidanților naturali, vitaminele C (acid ascorbic) A, E (tocoferoli) (Capitolul 5), constituie o primă etapă necesară propagării peroxidării. Odată peroxidarea inițiată, radicalii dezvoltați vor distruge resturile de antioxidanți naturali sau sintetici prezenți, cît și alte vitamine prezente ca B, D și K. Substratul peroxidării îl constituie acizii polidienici numiți și esențiali, linoleic (Δ 6,9) și linolenic (Δ 3, 6, 9), cu 18 atomi de carbon și arachidonic (Δ 6, 9, 12, 15). Acești acizi grași nesaturați constituie o vitamină F, deoarece lipsa lor din hrană produsă prin peroxidare determină instalarea acrodiniei, o boală prin deficiență nutritivă [72].

Deteriorarea gustului, apariția mirosului caracteristic, rînced, se datoresc produșilor de descompunere a hidroperoxizilor constituiți din aldehide, acizi volatili și CO_2 și determină caracterul toxic.

Evitarea factorilor prooxidanți (căldură, lumină, ioni metalici), o ambalare etanșeizată și mai ales folosirea antioxidanților sînt procedee obligatorii pentru protejarea acestor produse. Antioxidanții cei mai utilizați sînt cei fenolici (BHA, BHT, BHQ, Capitolul 5), galații, tocoferolii în amestecuri sinergice cu acizi ascorbic, citric sau fosforic [18, 69, 75].

Scanned with OKEN Scanner

În ultimul timp însă antioxidanţii de tip fenolic sînt înlocuiţi cu cei naturali (vitamine A, E, C) sau extracte de fosfolipide [81], din cauza unor lucrări [62, 80], care au arătat existenţa unor efecte toxice la nivelul unor bacterii sau celule în cultură.

Formarea unui film consistent la suprafaţa *uleiurilor sicative*, *vopselele*, *cerneluri* se datoreşte peroxidării oxidative ce determină ramificări prin implicarea esterilor acizilor dienici 1,3 şi 1,4. Cum acest efect este căutat, se adaugă un prooxidant sau agent de „uscare" cum sînt ioni metalici complexaţi (naftenaţi de cobalt). Studiile în infraroşu au confirmat [36] formarea hidroperoxizilor (bandă la 2,9 μ) premergător polimerizării. Pe măsură ce gradul de polimerizare creşte, absorbţia în infraroşu se complică prin apariţia unor benzi datorită descompunerii peroxizilor în alcooli (2,88 μ), carbonili (5,75 μ), eteri (9,2 μ), epoxizi (11,7 μ). Procesul de autooxidare continuă autocatalitic printr-o nouă formare de hidroperoxizi generaţi prin reacţii de fotosensibilizare. Grupările carbonil sînt responsabile de noi modificări ce duc la sciziunea lanţurilor, apariţia crăpăturilor şi distrugerea filmului. Prezenţa dioxidului de titan, a oxidului de zinc, a carbonatului de plumb din unele vopsele favorizează absorbţia radiaţiilor UV producînd prin reacţii fotosensibilizante peroxidarea uleiurilor sicative şi a celulozei. Cel mai eficient antioxidant pare să fie *tert*-dodecil mercaptanul, eficient în sisteme 1,3 şi 1,4-dienice ce acţionează atît prin accelerarea descompunerii peroxizilor, cît şi prin prevenirea formării lor [54].

6.5. ALIMENTELE

Pentru a fi consumate trebuie să aibă gust, miros şi culoare agreabile. În special gustul contează foarte mult şi alterări minore chimice sînt detectabile în alimente rîncezite. Grăsimile şi uleiurile animale sînt cele mai susceptibile la peroxidare datorită lipsei unor antioxidanţi naturali prezenţi în uleiurile vegetale ca de exemplu caroteni, vitamină A şi E. Variaţiile mari în sensibilitatea la peroxidare se datoresc raportului dintre cantitatea şi tipul acizilor graşi nesaturaţi şi calitatea antioxidanţilor naturali. Grăsimea rîncedă este toxică prin acţiunea asupra complexului de vitamine B [32]. Hrănirea şobolanilor cu grăsime rîncedă a produs o largă varietate de simptome dar care seamănă cu cele observate în avitaminoză dată de acizi graşi nesaturaţi esenţiali sau de vitamină E, fiind localizate la nivelul organelor de reproducere.

Acizii graşi nesaturaţi din componenţa grăsimilor, cărnii şi alimentelor derivate constituie substratul principal al peroxidării, care decurge după mecanismele expuse în Capitolele 2 şi 3, cu formarea hidroperoxizilor şi în final a produşilor de descompunere alcătuiţi din acizi şi aldehide volatile ce determină mirosul şi gustul specific (tabelul 6.1) [65, 77].

Peroxidarea alimentelor cunoscută popular ca rîncezire afectează nu numai untura, uleiurile comestibile şi carnea, dar şi cerealele, făina, laptele, dulciurile şi derivatele lor din cauza conţinutului în acizi graşi nesaturaţi. Rîncezirea este exemplul cel mai clasic de peroxidare în sens autocatalitic de reacţii în lanţ, cu secvenţe schiţate în tabelul 6.1. Cu cît gradul de rîncezire este mai avansat cu atît creşte toxicitatea alimentelor, fără însă a ajunge la letalitate.

Scanned with OKEN Scanner

În general prezența microorganismelor crește rîncezirea prin activarea lipazelor și a unor hidrolaze ce măresc cantitatea de substrat peroxidabil. Scăderea *pH*-ului favorizează, de asemenea, peroxidarea prin ușurarea acțiunii prooxidante a ionilor metalici. Întotdeauna rîncezirea începe de la suprafața alimentelor și de aceea ambalajul alimentelor se impregnează cu antioxidanți, mai ales de tip fenolic, sau este ferit de acțiunea luminii (staniol). Alimentele prăjite se rîncezesc mai ușor prin mărirea suprafeței și a prezenței acroleinei ce favorizează peroxidarea [27, 80].

Păsările tăiate și mai ales peștele rîncezesc ușor prin oxidarea antioxidanților naturali (ascorbat, grupări sulfhidril) sau prezenței hemoglobinei ce acționează prooxidant. Sarea protejează parțial, dar numai în cazul peștelui proaspăt. În nici un caz NaCl nu se pune peste carne sîngerîndă, deoarece acționează prooxidant [5, 86]. Procedeele empirice de conservare sînt de multe ori eficiente. Astfel afumarea cărnii aduce un aport de antioxidanți de tip fenolic [3, 23], iar învelirea cărnii în frunze sau a brînzei grase în coajă de copaci furnizează antioxidanții naturali necesari conservării. Maioneza nu se rîncezește din cauza acțiunii protectoare a acidului ascorbic din lămîie, a gălbenușului de ou și a părții nesaponifiabile din ulei.

Semințele de cereale, metabolizarea substraturilor ce le conțin, continuă într-un ritm încetinit. Căldura și umezeala permit rîncezirea hidrolitică, cît și dezvoltarea ciupercilor. Lipaza din cereale necesită o umezeală de 15% și o temperatură de 30° pentru a scinda acizii grași peroxidabili din gliceride. Echilibrul temperatură-umezeală constituie o problemă pentru silozuri. În schimb făina nu rîncezește la umezeală mare, dar la 5% și chiar mai puțin se alterează.

În fața unor factori atît de variați legați de mediu ce se adaugă marii diversificări naturale, antioxidanții utilizați aparțin unor categorii diferite ca mecanisme. Amestecuri sinergice de fenoli (BHA, BHT, NDGA, galați), cu acid ascorbic, lecitină, tocoferoli, acid tiodipropionic sînt cele mai des folosite. Deși sînt mai ieftini, antioxidanții sintetici tind să fie înlocuiți cu cei naturali din cauza unui risc potențial semnalat deja la secțiunea 8.4.

6.6. UTILIZAREA INDUSTRIALĂ A PEROXIZILOR

În secțiile precedente am semnalat tendința recentă de utilizare a peroxizilor pentru modificarea în sensul dorit a polimerizării sau ramificării *(cross-linking)* a unor monomeri și polimeri. În ultimul timp se acordă din ce în ce mai multă atenție celui mai simplu peroxid, H_2O_2, peroxidul de hidrogen sau apa oxigenată. Stabilitatea și prețul redus de cost îl avantajează.

Laptele conține un procent destul de ridicat în acizi grași nesaturați, mai ales linoleic, implicați în aroma și gustul acestui aliment [79]. Prin fierbere acești acizi sînt parțial distruși împreună cu antioxidanții naturali. Adăugarea de H_2O_2 0,03% permite o evitare a acțiunii bacteriilor, păstrarea aromei naturale și inactivarea unor pesticide poluante [20, 71].

Îmbătrînirea artificială a vinurilor albe apelează la peroxizi care prin produșii de descompunere contribuie la formarea buchetului. În timp

Scanned with OKEN Scanner

ce coloranţii sintetici din vinul roşu nu se oxidează cu H_2O_2, adăugarea acestui peroxid vinului roşu natural produce schimbarea culorii.

Adăugarea antioxidanţilor la produsele farmaceutice este obligatorie din cauza sensibilităţii la autoxidare a grăsimilor şi uleiurilor utilizate în multe preparate [12, 17, 86].

Tratarea apelor reziduale a devenit o necesitate mai ales în marile oraşe. Mai multe patente recomandă folosirea H_2O_2, fie ca atare [52, 61] sau în combinaţie cu ioni metalici (Fe, Mn) şi cărbune activ [58, 81]. În acest ultim caz se aplică o combinaţie asemănătoare reactivului Fenton (Capitolul 1) în care se produc cantităţi însemnate de radicali liberi ai O_2 cu mare capacitate oxidantă.

Capacitatea oxidantă a H_2O_2 sau a peroxizilor anorganici este folosită pentru albirea lînii [16], a diferitelor textile [40], recuperarea hîrtiei uzate şi îndepărtarea cernelii [64], înălbirea pulpei de celuloză [29], îmbătrînirea artificială a lemnului [8], solidificarea alginaţilor necesari în industria alimentară [43], purificarea apei potabile [24], ameliorarea unor sorturi de brînzeturi de tip cedar [27].

Iradierea cu radiaţii ionizante a unor alimente peroxidabile cum sînt uleiurile comestibile, carnea în scopul conservării aseptice a fost destul de larg răspîndită, fiind un mijloc rapid şi destul de rentabil. Din păcate cercetările ulterioare au arătat [9, 82] că la dozele mari utilizate 10^4—10^7 Rads Co^{60} sînt afectate unele proprietăţi (gust, miros) prin creşterea cantităţii de peroxizi. Aşa cum am arătat la iradierea polimerilor (6.2.6), datorită formării unor radicali peroxi, aceştia vor iniţia peroxidarea unor substraturi favorabile şi după terminarea iradierii, astfel că în alimentul iradiat vor creşte compuşii carbonili rezultaţi din descompunerea peroxizilor. Concomitent sînt parţial distruşi unii antioxidanţi naturali cum sînt vitaminele C, A, E, caroteni.

Un alt aspect aplicativ, de asemenea încă în stare incipientă, este folosirea peroxizilor în medicină. Despre acest ultim aspect se va discuta în partea a doua a lucrării.

BIBLIOGRAFIE

1. L. ANISIC, P. MARTIN, *Technol. Mitt. Krupp Forsch.*, **36**, 19 (1978).
2. Z. M. BACQ, P. ALEXANDER, „Fundamentals of Radiobiology", vol. 5, Pergamon, Oxford, 1966.
3. J. A. BARTER, D. E. KELLER, *J. Polymer Sci.*, **15**, 2545 (1977).
4. L. BAUM, *J. Appl. Polymer., Sci.*, **2**, 281 (1959).
5. N. BAYLKO, *Pure Appl. Chem.*, **49**, 1667 (1977).
6. E. M. BEVILAQUA, *Science*, **126**, 396 (1957).
7. E. M. BEVILAQUA în (51), cap. 18.
8. V. A. BELÎI, L. FEDOROV, USSR Patent, 601, 162 (1978).
9. R. H. BISBY, A. K. DAVIS, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 825 (1978).
10. H. J. BOLES, U. S. Patent, 3, 964, 950 (1976).
11. J. L. BOLLAND, H. HUGHES, *J. Chem. Soc.*, **45**, 93 (1949).
12. A. BONDI, „Physical Chemistry of Lubricating Oils", Reinhold Publ., New York, 1951.
13. A. F. BOVEY, „The Effects of Ionizing Radiations on Natural and Synthetic high Polymers, Interscience Publ., London, 1958.

Scanned with OKEN Scanner

14. R. A. BREDERODI, A. A. STEINKAMPF, Ger. Offen, 2, 647, 700 (1978).
15. F. BROUSSARD, G. TABACCO, Ger. Offen, 2, 752, 345 (1978).
16. J. CEGARRA, J. GRACEN, *Textilveredlung*, **11**, 390 (1976).
17. J. R. GHIPAULT, în (51), cap. 12.
18. C. COCIASU, *Inf. Docum. Selectivă* I.C.C.C., **2**, 1 (1977).
19. G. H. DENISON, *Ind. Eng. Chem.*, **36**, 477 (1944).
20. R. DEPOMMER, E. MARTIN, Belg. Patent, 825, 241 (1975).
21. M. A. DIKII, M. S. VAIDA, USSR Patent, 572, 453 (1976).
22. B. DOGADKIN, A. DOBROMYSLOVA, *Rubber Chem. Technol.*, **32**, 184 (1959).
23. K. DOWNEY, *J. Soc. Dairy Technol.*, **22**, 154 (1969).
24. H. EGGENSPERBERGER, Ger. Offen, 2, 655, 599 (1978).
25. G. S. EGERTON, *J. Textil. Inst.*, **39**, T305 (1958).
26. J. EHINA, Japan Kokai, 78, 23, 342 (1978).
27. A. M. EL SAFTY, M. MOHAMMED, *Eggypt Diary Sci.*, **5**, 223 (1977).
28. E. F. EVANS, L. F. MC BURNEY, *Ind. Eng. Chem.*, **41**, 1256 (1949).
29. T. FUJI, Japan Kokai, 78, 14, 803 (1978).
30. T. FUNAKI, Japan Kokai, 76, 147, 565 (1976).
31. A. K. GOSH, C. K. DAS, *J. Polymer. Sci. Polmer.*, **15**, 2773 (1977).
32. S. M. GREENBERG, A. C. FRAZER, *J. Nutrit.*, **50**, 421 (1953).
33. M. HAMADA, S. YOSHIDA, Japan Kokai, 78, 401, 050 (1978).
34. W. L. HAWKINS, R. L. HANSON, *J. Appl. Polymer. Sci.*, **1**, 43 (1959).
35. V. HIRMANN, Ger. Offen, 2, 554, 944 (1977).
36. F. J. HOMM, I. I. SEZMAN, *J. Am. Chem. Soc.*, **71**, 812 (1949).
37. E. HORAN, Ger. Offen, 2, 640, 664 (1976).
38. N. G. IVANOVNA, A. S. GLEBKO, *Plasti Massy* **8**, 49 (1976).
39. N. G. IVANOVNA, E. I. EVDOKIMOV, *Plasti Massy* **6**, 67 (1976).
40. D. K. JONES, U. S. Patent, 4, 032, 292 (1977).
41. A. G. KEITH, *Ind. Eng. Chem.*, **49**, 1775 (1957).
42. V. S. KEMATH, Ger. Offen, 2, 756, 060 (1978).
43. F. KIUCHI, Japan Kokai, 77, 53, 898 (1977).
44. H. KUMMEL, G. HANTISCH, *Kautsch. Gummi*, **29**, 455 (1976).
45. I. M. KUCHNOV, T. I. ZIVALKINA, *Plasti Massy*, **10**, 53 (1977).
46. S. KURONIMA, S. YANAGY, Japan Kokai, 76, 50, 392 (1976).
47. A. S. KUZNUNSKI, T. G. DEGTOVA, *Rubber Chem. Technol.*, **29**, 576 (1956).
48. J. LERCOVA, L. KATULAK, *J. Polymer Sci.*, **35**, 57 (1977).
49. W. G. LLOYD, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 72 (1956).
50. M. K. LOCK, F. B. SAGOR, *Proc. Chem. Soc.*, **158** (1960).
51. W. O. LUNDBERG (edit.), „Autoxidation and Antioxidants", Interscience J. Wiley, New York, vol. 2, 1961.
52. S. J. MASUOKA, J. G. KAPSALIS, *J. Food Process.*, **1**, 153 (1977).
53. L. O. MASGOLI, D. C. NALLER, U. S. Patent, 3, 956, 396 (1976).
54. L. R. MATISOVA, J. RYCHLY, I. PASKA, *J. Lumminis.*, **17**, 73 (1978).
55. F. R. MAYO, *Ind. Eng. Chem.*, **52**, 614 (1960).
56. E. T. MC DONEL, J. R. SHELTON, *J. Chem. Eng. Data*, **4**, 360 (1959).
57. D. MIKULASOVA, V. PUCHIN, USSR Patent, 513, 044 (1976).
58. R. K. MILLER, Franc. Demande 2, 267, 329 (1976).
59. T. NISHIGAWA, Japan Kokai, 78, 47, 464 (1978).
60. H. NISHIZAWA, Japan Kokai, 76, 021, 119 (1976).
61. A. C. NIXON, în (51) cap. 17.
62. G. PASCAL, *Rev. Franc. Corps Gras*, **25**, 239 (1978).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 7

PEROXIZII ÎN MEDII BIOLOGICE

Complexitatea, varietatea și importanța economică a peroxidării și implicit a autoxidării au fost prezentate în prima parte a cărții. În partea a doua, vom arăta implicațiile peroxidării în mediile biologice, subliniind faptul că oxigenul, deși indispensabil vieții, poate fi toxic, prin activare în formele active, singlet ($^1O_2$) sau superoxid ($O_2^{\cdot-}$). Aceste forme active pot acționa ca atare sau prin producere de peroxizi, fiind, în anumite limite, necesari desfășurării proceselor metabolice (Capitolul 1).

Aceleași mecanisme descrise în capitolele 2, 3 și 4 vor acționa și în mediile biologice dar în condiții și cu factori activanți sau inhibanți diferiți și cu o varietate mult mai mare.

Spre deosebire de peroxidarea din medii nebiologice, unde odată apărută va evolua autooxidativ și autocatalitic pînă la distrugere, în celulele vii există sisteme de protecție foarte eficiente ce vor inhiba excesul de peroxizi la diferite nivele de formare (Capitolul 9).

Așa cum s-a arătat în capitolele precedente (2—6), peroxizii deși constituie principalii compuși intermediari cu greu mai pot fi măsurați în etapele finale ale autooxidării. Această caracteristică este valabilă și în medii biologice și din păcate nu este înțeleasă, fapt ce produce interpretări multiple ale unor determinări sau mecanisme. În plus, nu există încă metode perfecte de determinare a peroxizilor pentru medii biologice, cele utilizate în chimie nu sînt aplicabile (Capitolul 12).

7.1. OXIGENUL, FORMELE LUI ACTIVE ȘI VIAȚA

Se afirmă, cu certitudine, că oxigenul a apărut relativ tîrziu în atmosfera planetei terestre. Astfel, socotind începutul sistemului solar la 4,5 miliarde ani, se apreciază apariția O_2 în atmosferă datînd de numai 2 miliarde ani ca urmare a activității bacteriilor fotosintetizante (tabelul 7.1.). Lipsa oxigenului a fost o necesitate ce a permis aglomerarea materiilor prime din care au apărut primele alge. De altfel, aminoacizii sînt stabili la temperaturi moderate doar în absența O_2 [4, 78].

Din cauza potențialului înalt oxidant și a reactivității sale lente O_2 ocupă o poziție specială și nu întîmplător a devenit un excelent combustibil pentru alimentarea proceselor metabolice aerobe. Datorită reactivității sale lente (Capitolul 1), O_2 prezintă vieții aerobe două aspecte: de element indispensabil și de toxic, datorită formelor sale active $O_2^{\cdot-}$ și

Scanned with OKEN Scanner

Tabelul 7.1

Evoluția paralelă a vieții și a concentrației O_2 atmosferice

Ani (milioane)	Perioada geologică	Forma biologică	Concentrația O_2 (PAL) *	Componența SOD*
4 500				
3 500		Originea vieții	0,00001	
3 000		Bacterii fotosintetice anaerobe		
2 500				
2 500		Bacterii fotocian-sintetice	0,0001	Mangan
2 000		Apariția O_2 în componența organismelor	0,001	Mangan și Fer
1 500		Alge eucariote		Cupru și Zinc
600	Precambrian	Plante și animale multicelulare	0,01	Diversificare după organ
350	Devonian	Viața terestră	0,1	
?			1	

*PAL = *(Present Atmospheric Level)*, nivelul prezent al concentrației O_2.
*SOD = Superoxid dismutaza, enzima care catalizează disproporționarea $O_2^{\cdot-}$

$^1O_2$, care tind spre distrugerea ei. Această caracteristică a permis O_2 să constituie un factor în evoluția vieții pe pământ [1, 76].

Reacțiile fotosensibilizante au avut un rol major în sinteza componentelor celulare în condițiile unor radiații UV intense. Oxigenul inițial provine din silicații abundenți din prima crustă terestră. În funcție de concentrațiile locale în CO, CO_2 și CH_4 s-au creat modificări regulatorii ale producerii O_2 stabilind un prim nivel atmosferic în jur de 10^{-5} PAL (tabelul 7.1.). Această concentrație deși foarte mică a permis formelor active ale O_2 să atace metalele de pe suprafața Pământului formînd oxizi. Straturile reci ale stratosferei au obligat vaporii de apă să nu părăsească atmosfera terestră limitînd prin aceasta pătrunderea radiațiilor UV la lungimi mai mari de 200 nm, unde numai O_2 și O_3 absorb. Prezența O_2 a permis diversificarea căilor metabolice, deoarece utilizarea lui drept combustibil produce un randament superior fermentației anaerobe. Prin reacții fotosensibilizante și temperaturi ridicate, O_2 a trecut ușor în forme activate permițînd obținerea unor noi compuși.

Apariția primelor celule fotosintetizante (2 miliarde ani) a permis creșterea marcată a O_2 atmosferic și formarea stratului protector de O_3 față de radiațiile UV nocive cu lungime de undă 240—280 nm. Primul nivel critic al O_2 de 0,01 PAL din Precambrian a coincis cu o expansiune explozivă a vieții, observabilă și în fosilele acumulate. Adaptarea la folosirea O_2 de către algele verzi a însemnat și crearea primei arme de apărare față de aspectul toxic al O_2 prin apariția superoxid dismutazei, enzimă ce descompune excesul de $O_2^{\cdot-}$. În timp ce algele ce pot trăi și anaerob conțin SOD având ca parte activă Mn sau Fe, organismele eucariote vor avea SOD conținînd Cu și Zn ca părți active. Faptul că SOD din mitocondriile de mamifere conține Fe și Mn, ca și bacteriile sau cloroplaste sugerează o origine comună simbiotică [20].

Scanned with OKEN Scanner

Acumularea unor mari cantităţi de O_2 datorită fotosintezei a produs un al doilea nivel critic de 0,1 PAL în Devonian permiţînd astfel crearea condiţiilor pentru dezvoltarea vieţii terestre.

Rolul O_2 ca factor în evoluţia vieţii constituie o ipoteză recentă, [78], cu multe dovezi favorizante. Nu vom discuta această problemă, dar prin prezentarea acestei ipoteze am atras atenţia asupra importanţei cunoaşterii rolului dublu al O_2 şi a înzestrării organismelor vii încă de la început cu forme de apărare contra toxicităţii oxigenului : SOD.

7.2. SISTEME BIOCHIMICE DE FORMARE A PEROXIZILOR

Lucrări numeroase din ultimii 10 ani au permis cunoaşterea unor sisteme biochimice ce produc într-o primă etapă activarea O_2 prin generarea radicalilor $^1O_2$ şi $O_2^{\cdot-}$, iar ulterior creează condiţii pentru apariţia peroxizilor în celule. În Capitolul 1 au fost descrise formarea şi proprietăţile acestor specii reactive ale O_2 în general, cu unele indicaţii biologice. Principala sursă de aceste specii o constituie reducerea completă a O_2 la H_2O, proces ce are loc succesiv prin etape univalente în cursul cărora apar $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 şi $OH^{\cdot}$. Enzimele oxidative au ocolit restricţia de spin (Capitolul 1.1) ce favorizează reducerea univalentă şi pot realiza o reducere bivalentă (flavoproteine) sau chiar tetravalentă (tirozinază) fără eliberare de intermediari nocivi. Astfel majoritatea O_2 consumat de celulele ce respiră este utilizat de citocrom oxidază, ce reduce O_2 la H_2O fără formarea $O_2^{\cdot-}$ sau H_2O_2. Cu toate acestea în organisme se produce şi o reducere univalentă a O_2, probabil sub 10 % din O_2 consumat [21]. În cursul evoluţiei vieţii, organismele folosesc calea univalentă de reducere a O_2 pentru obţinerea speciilor reactive necesare labilizării unor substraturi în vederea unor biosinteze. Excesul de specii reactive ale O_2 este rapid descompus prin sistemele de apărare specifică (Capitolul 9).

A. Producerea superoxidului, $O_2^{\cdot-}$, constituie prima etapă în complicatul proces de formare a peroxizilor în organismele aerobe. În ultimii ani s-au descoperit un număr surprinzător de mare de reacţii biochimice ce generează $O_2^{\cdot-}$. Lista, desigur incompletă, cuprinde în primul rînd un grup variat de substanţe cu structuri diverse cum sînt : hidrochinone [50], catecolamine [11], tioli [52], tetrahidropterine [15], feredoxine [49], hemoglobină şi mioglobină [51]. Un alt grup este constituit din enzime cum sînt flavinenzimele (xantin oxidaza, aldehid oxidaza) [19], galactozoxidaza [32], indolamin oxigenaza [35], 2-nitropropan dioxigenaza [40]. Un al treilea grup este constituit din organite subcelulare, cum sînt mitocondriile [8], microzomii [55] şi cloroplastele [29] sau celule cum sînt leucocitele polimorfonucleare sau granulocitele [10].

În toate aceste cazuri, $O_2^{\cdot-}$ este format în mod obişnuit în cursul acţiunii catalitice, superoxidul fiind considerat ca un component minor intermediar. Aşa cum a fost prezentat în Capitolul 1.3, mecanismul producerii $O_2^{\cdot-}$ nu este simplu. Sistemul enzimatic cel mai studiat a fost xantina-xantin oxidază. Mecanismul propus de Fridovich [18] presupune că după oxidarea xantinei în acid uric, forma redusă a xantin oxidazei (EH_2)

Scanned with OKEN Scanner

este reoxidată prin două căi alternative. Calea de transfer electronic univalentă produce $O_2^{\cdot-}$ conform reacției de mai jos :

$$EH_2 + 2\,O_2 \longrightarrow E + 2\,O_2^{\cdot-} + 2\,H^+ \qquad (1)$$

în timp ce a doua cale produce H_2O_2 printr-un transfer de 2 electroni :

$$EH_2 + O_2 \longrightarrow E + H_2O_2 \qquad (2)$$

Cazul cel mai complicat pare să fie oxidarea flavinelor sau a flavinenzimelor, datorită formării mai multor specii reactive în urma reducerii flavinelor. Schema ipotetică prezentată în fig. 7.1. încearcă să explice marea varietate a formelor intermediare flavinice în funcție de eliberarea unor specii reactive ale oxigenului.

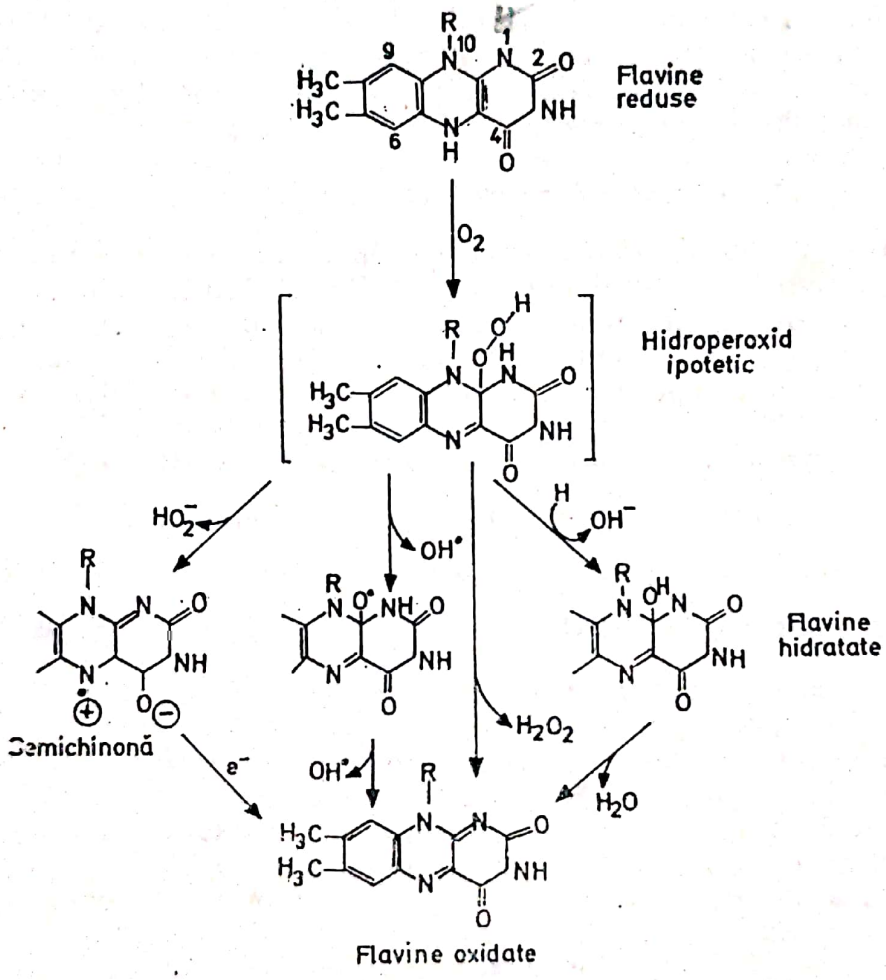


Fig. 7.1. Oxidoreducerea secvențială a flavinelor și implicarea formelor active ale oxigenului

B. A doua etapă a procesului de peroxidare în medii biologice constă în transformarea $O_2^{\cdot-}$ sau formarea simultană de alte specii reactive ale O_2, cum sînt singlet, $^1O_2$, hidroxil, $OH^\cdot$, sau peroxid de hidrogen, H_2O_2. De cele mai multe ori se produce o formare simultană a acestor radicali așa cum se observă în fig. 7.1 sau în urma iradierii cu radiații ionizante

Scanned with OKEN Scanner

(Capitolul 4.4). Această etapă va fi discutată în detaliu în Capitolul 8, iar posibilitățile teoretice au fost discutate în capitolul 1 (1.2, 1.4).

Oxigenul în stare singlet, $^1O_2$, a fost detectat în sisteme enzimatice cum sînt adrenoxin reductaza [26], xantin oxidaza [63], prostaglandin sintaza [68] și citocrom P—450 oxidat [14, 80]. Radicalul hidroxil a fost de asemenea detectat în unele sisteme biologice cum sînt cele implicate în deteriorarea membranelor lizozomale [27] sau hidroxilarea microzomială dependentă de NADPH [30]. În aceste cazuri, formarea acestor radicali este necesară organismului pentru labilizarea, oxidarea și transformarea unor substraturi organice.

C. A treia etapă a procesului de peroxidare în medii biologice constă în formarea peroxizilor, în special lipidici, în urma acțiunii speciilor reactive ale O_2. Aceasta este etapa cea mai puțin clarificată ca mecanism de acțiune și de elucidarea ei depinde înțelegerea întregului proces de peroxidare în medii biologice. Deocamdată există doar o singură ipoteză susținută destul de sugestiv experimental, emisă de Kellog și Fridovich [39] și independent de Pederson și Aust [63]. Această ipoteză se bazează pe reacția Haber-Weiss (Capitolul 1, pag. 19), care este de forma:

$$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \longrightarrow OH^- + OH^{\cdot} + O_2$$

Reacția Haber-Weiss poate avea loc și în medii biologice mai ales prin cuplare cu reducerea unui complex al Fe^{3+}. Experimental, aceasta se realizează cu un sistem mai complicat format din cuplarea succesivă a unor reacții parțiale. Drept sursă de $O_2^{\cdot-}$ se alege reacția catalizată de xantin oxidază, ce produce totodată și radicalul $OH^{\cdot}$ [16]:

$$3\,O_2 + \text{xantină} \xrightarrow{\text{xantin oxidază}} \text{acid uric} + O_2^{\cdot-} + OH^{\cdot} + H_2O_2$$

$$Fe^{3+} - \text{complex} + O_2^{\cdot-} \longrightarrow O_2 + Fe^{2+} - \text{complex}$$

$$Fe^{2+} - \text{complex} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} - \text{complex} + OH^{\cdot} + OH^-$$

$$\text{acid linoleic} + OH^{\cdot}\ (^1O_2) \longrightarrow \text{linoleic hidroperoxid (LHAPO)}$$

Acest sistem cuplat de reacții a fost demonstrat experimental [86, 92]. Peroxizii lipidici pot fi produși în medii biologice după acest mecanism și prin înlocuirea diferiților componenți. Astfel pentru complexul Fe^{3+} drept ligand poate fi folosit EDTA sau ADP pînă la o concentrație maximă de 1—2 mM peste care se obțin efecte inhibitorii, sau combinații deja existente cum sînt hemoglobina ori citocromii. În loc de sistemul xantină -xantin oxidază pot fi utilizate și alte surse de $O_2^{\cdot-}$, așa cum vor fi menționate în continuare. Experimental s-au folosit descărcări în gaze prin radiofrecvență [70], fotosensibilizare cu clorofilă [17], lipoxigenază [34], reacții în care se produce și oxigen în stare singlet $^1O_2$.

Dovezi suplimentare în favoarea implicării formelor active ale O_2 în mecanismul peroxidării în medii biologice au fost aduse prin utilizarea inhibitorilor specifici pentru acești radicali. Astfel $O_2^{\cdot-}$ este captat de Mn^{2+} și Santoquin (2,2,4-trimetil-6-etoxi-1,2-dihidrochinolină) sau descompus prin acțiunea superoxid dismutazei; $^1O_2$ este captat specific de 1,3-difenil-izobenzofuran, iar $OH^{\cdot}$ de manitol sau etanol. Adăugarea acestor captatori specifici sau a unor captatori de radicali nespecifici cum sînt difenil-

Scanned with OKEN Scanner

-*p*-fenilendiamină sau acid 6-hidroxicroman-2-carboxilic (partea hidrosolubilă a vitaminei E) produce de cele mai multe ori inhibiţii mult semnificative ale peroxidării acizilor graşi nesaturaţi sau a unor reacţii asociate cum este reducerea citocromului c de către xantin oxidază [16, 39, 63]. Rezultatele uneori controversate [53, 83] se datoresc condiţiilor experimentale diferite. După cum arată Fong et al. [16], inhibitorii formelor activate ale O_2 acţionează concludent numai dacă sînt prezenţi în mediul de reacţie de la început, adică să poată capta $O_2^{\cdot-}$. Un alt factor care modifică rezultatele experimentelor este diferenţa de solubilitate în medii apoase şi lipidice. Peroxidarea lipidelor din membranele celulare nu va fi inhibată de compuşi hidrosolubili, inclusiv enzime ca superoxid dismutaza ori catalaza. Cînd radicalii liberi sînt produşi în fază apoasă, aşa cum ar fi atacul lizozomilor de către sistemul xantin oxidază, captatorii hidrosolubili amintiţi sînt eficienţi [86].

Radicalul hidroxil, $OH^{\cdot}$, fiind foarte reactiv va acţiona neselectiv (Capitolul 1.5) prin reacţii caracteristice de extragere a unui atom de hidrogen sau de adiţie de legături π. Acizii graşi polinesaturaţi din membranele celulare şi subcelulare sînt un substrat adecvat cu condiţia ca generarea oxigenului activat să se producă în apropiere, deoarece difuziunea acestor specii este foarte limitată [16, 33].

7.3. SUBSTRATURI ALE PEROXIDĂRII ÎN MEDII BIOLOGICE

În medii biologice cel mai important peroxid este H_2O_2 şi de aceea va fi tratat separat în Capitolul 8. Substratul cel mai răspîndit şi important îl constituie *acizii graşi polinesaturaţi*, prezentaţi în capitolul 3.1. De asemenea în Capitolul 6.4, 6.5 s-a arătat că şi în alimentele de origine animală prezenţa acestor acizi constituie substratul favorabil producerii rîncezirii produselor. În medii biologice, aceşti acizi polinesaturaţi sînt o parte componentă a membranelor celulare şi subcelulare. Peroxidarea implică reacţia directă a formelor active ale O_2 cu sistemul conjugat al acidului gras (Capitolul 3.1) formînd radicali liberi intermediari şi peroxizi semistabili. Catalizatorii cei mai eficienţi sînt ionii metalelor de tranziţie, hemoproteine, radicalii proveniţi din radioliza apei sau din reacţii fotosensibilizante (Capitolul 3.3 şi 7.4). Peroxizii lipidici odată formaţi suferă sciziuni homolitice ce duc la propagare în lanţ, reacţii de ramificare şi de descompunere în special în carbonili. În fig. 7.2 este prezentat un mecanism schematic al peroxidării acizilor graşi (*LH*), cu formarea radicalilor liberi (*L*), de descompunere (*LO*$^{\cdot}$), a hidroperoxizilor (*LOOH*). Printre produşii de descompunere ai peroxizilor lipidici cel mai răspîndit este malonic dialdehida (*MDA*), a cărei determinare (Capitolul 12) a constituit mult timp singura dovadă a producerii peroxizilor lipidici în medii biologice. Din păcate descompunerea hidroperoxizilor nu este reproductibilă, deoarece pot apărea 1—2 molecule de malonic dialdehidă pentru o moleculă de acid gras peroxidat [48]. Ţinînd seama de complexitatea descompunerii peroxizilor (Capitolul 3.2) în ultimul timp se propune determinarea mai multor produşi de descompunere cum sînt etilenă [93], CO_2 [66] sau a radicalilor dezvoltaţi prin metode fizice cum sînt rezonanţa electronică de spin sau

Scanned with OKEN Scanner

chemiluminiscenţa (Capitolul 1 şi 12). Rezultatele determinărilor de peroxizi lipidici în medii biologice vor fi discutate în Capitolul 10—11, în cadrul aspectului patologic al peroxidării.

Steroizii se autooxidează destul de uşor producînd o gamă largă de hidroperoxizi şi produşi de descompunere [82]. Astfel din colesterol se obţin 5- şi 7-hidroperoxicolesterol, 7β-, 7α- şi 25-hidroxicolesterol, 7-cetocolesterol, colestan-3β,5α,6β-triol [65]. Au mai fost preparaţi 6β-hidro-

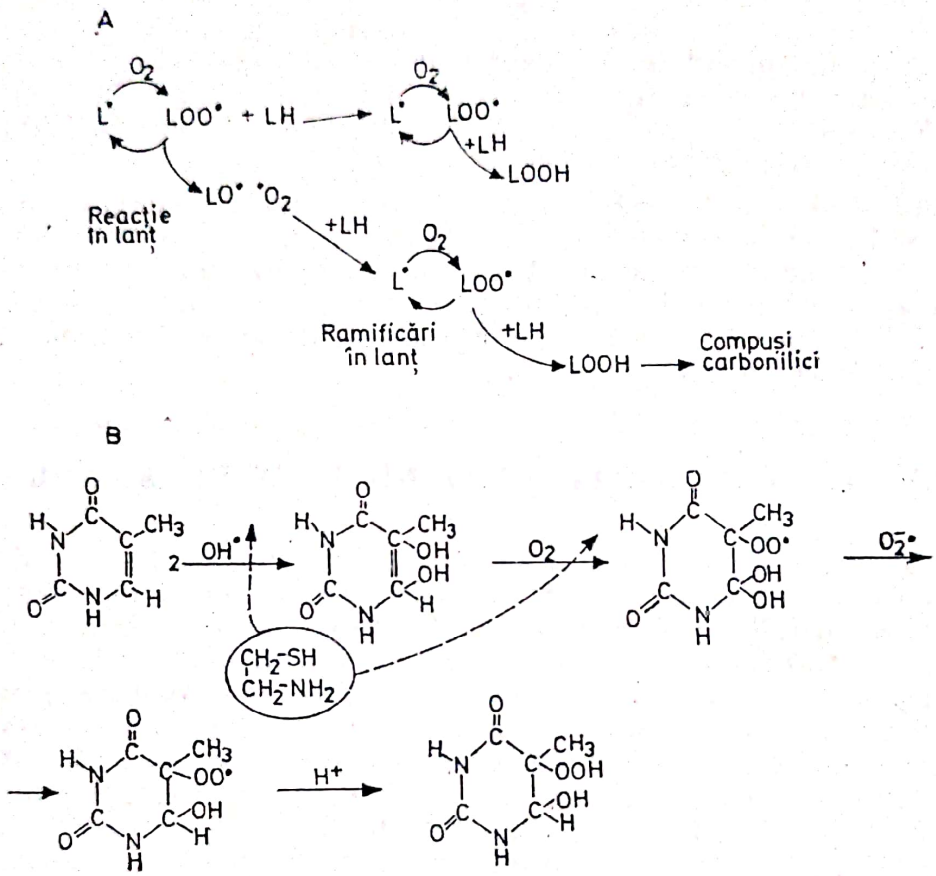


Fig. 7.2. Mecanisme ale producerii de peroxizi în medii biologice. A. Peroxizi lipidici. B. Peroxidarea timinei şi acţiunea radioprotectoare a cisteaminei

peroxiprogesteronă, 6β-hidroperoxiandrostenedionă din 5-enă-3-cetosteroizii corespunzători [94]. Rolul ipotetic al acestor peroxizi în ateroscleroză va fi discutat în Capitolul 10.

Bazele pirimidinice ale acizilor nucleici sînt peroxidate în urma acţiunii radiaţiilor ionizante [43, 75]. Conform schemei din fig. 7.2. B, mecanismul propune un atac al OH· (rezultat din radioliza apei (Capitolul 4.4) asupra legăturii 5—6 a pirimidinelor şi formarea intermediară a unui radical hidroxihidroperoxipirimidil. Doar peroxidul corespunzător timinei este mai stabil şi a putut fi sintetizat în formă cristalină. Peroxizii derivaţi din uracil şi citozină sînt instabili trecînd în glicoli şi în final la stadiul de acid izobarbituric. În soluţii aerate peroxidarea pirimidinelor poate fi

protejată printr-un radioprotector cunoscut, mercaptoetilamină, care acționează ca un antioxigen, în primele etape (fig. 7.2.B). Radicalii OH· mai produc radicali liberi și din pentozele ce fac parte din acizii nucleici prin extragere de atomi de hidrogen [9]. Datorită dimensiunilor relativ mari ale acizilor nucleici față de alte componente celulare, ei constituie o țintă preferată pentru radicalii OH· și alți radicali rezultați din acțiunea radiațiilor ionizante (Capitolul 4.4).

În medii biologice au mai fost detectați endoperoxizi intermediari în biosinteza prostaglandinelor (Capitolul 7.4) [54], epoxizii rezultați din metabolizarea unor hidrocarburi cancerigene și reacția lor cu acizi nucleici [75]; această reacție va fi tratată în Capitolul 11.

Mager și Berends [46] au emis ipoteza formării unor hidroperoxizi intermediari în autooxidarea flavinelor și pteridinelor, ca rezultat al interacției dintre flavinsemichinone și O_2. Experimental, Olinescu [60] a demonstrat că în cursul autooxidării flavinelor, atît enzimatic cît și fotosensibilizant, H_2O_2 este singurul peroxid care se formează.

7.4. PROOXIDANȚI ÎN MEDII BIOLOGICE

În Capitolul 3.3 a fost prezentată importanța prooxidanților pentru peroxidarea în medii nebiologice, insistînd asupra acțiunii ionilor metalelor tranziționale (Fe, Cu, Co). În medii biologice, acțiunea prooxidanților este și mai necesară datorită sistemelor de protecție foarte eficiente (Capitolul 9). De asemenea, varietatea prooxidanților deși nu este foarte mare cuprinde însă compuși ce acționează după mecanisme diferite. În tabelul 7.2 este prezentată eficiența acestor prooxidanți. Din tabelul 7.2 se observă clar marea diferență în eficiență între diferiți prooxidanți, în special marea capacitate a lipoxidazei în concordanță cu valoarea mică a energiei de activare (E_a).

Tabelul 7.2.

Eficiența principalilor prooxidanți asupra vitezei oxidării acidului linoleic la 6°C (moli linoleat oxidat/mol compus/oră)

Compus prooxidant	Viteza	E_a kcal/mol	Ecuația cinetică
Lipoxidază (grîu)	10^4	6,5	$dO_2/dt = k$ [peroxid]
Hematină	10^2	3,3	$dO_2/dt = k_2$ [peroxid]$^{1/2}$
Metaloproteine (Cu)	1		
Ioni metalici	10^{-1}		
Benzoil peroxid	10^{-3}	20,5	$dO_2/dt = k$ [peroxid]$^{1/2}$

7.4.1. IONI METALICI

Spre deosebire de studiile prezentate în Capitolul 3.3, în medii biologice acțiunea catalitică a ionilor metalici trebuie studiată în medii apoase și la *p*H în jurul neutralității. În studiul întreprins de Wills [91] rezultă

Scanned with OKEN Scanner

clar că eficiența cea mai mare (exprimată în µl O_2 consumat) este dată în ordine descrescătoare: Co^{2+} 170, Mn^{2+} 136, V^{2+} 14, Cu^{2} 9,0, Fe^{2+} 5,8. În toate cazurile, metalele prezintă două stări de oxidare interconvertibile printr-un transfer de un electron. Ținînd seama de concentrația fiziologică în țesuturi a primelor elemente (10^{-6}M), de efectul de scădere a acțiunii catalitice în urma complexării cu unii aminoacizi, rămîne foarte probabilă doar capacitatea redusă a Fe^{2+}. În schimb activitatea catalitică a Fe este crescută mult prin complexare cu *o*-fenantrolină, EDTA, ADP și în special porfirine sau prin adăugarea unui agent reducător cum este acidul ascorbic. Cataliza peroxidării acizilor grași prin Fe^{2+} sau Fe^{3+} este maximă la *p*H 5,5, fiind inhibată la *p*H alcalin și de concentrații mai mari de liganzi (mM) ca fosfați, EDTA. Reducători ca ascorbat sau cisteina măresc doar activitatea catalitică a Fe dar nu și a altor ioni metalici. La *p*H acid emulsiile de acizi grași tind să precipite, creșterea stabilității acestora poate fi asigurată prin albumină sau ser diluat. În schimb prezența proteinelor micșorează mult efectul prooxidant al ionilor de Fe.

7.4.2$_5$ HEMOPROTEINE

Principalii compuși ce conțin gruparea hem au un efect prooxidant marcat. Exprimînd capacitatea prooxidantă în nmol O_2 consumat/minut/ /nmol hem [37] s-a obținut următoarea scară comparativă: hematină 348, microperoxidază 320, methemoglobină 19, citocrom c 4,4, peroxidază din hrean 1,6, mioglobină 0,8, hemoglobină 0,3, citocrom P450 0,2, toți compușii fiind în concentrație de 10^{-6} M. Lewis și Wills [44] au arătat că pentru compușii hem domeniul optim prooxidant este situat între $5 \cdot 10^{-7}$—$1 \cdot 10^{-5}$ M, iar de la $5 \cdot 10^{-5}$M efectul inhibitor predomină. Preparatele vechi de cîteva zile au activitate catalitică mult redusă. Kaschnitz și Hatefi [37] au arătat că și unele proteine ce conțin Fe și S pot cataliza peroxidarea acizilor grași, în special ferdoxine din *C. pasteurianum*, succinat dehidrogenaza și Fe-S-proteina din complex I. Compușii conținînd hem activează scindarea homolitică a hidroperoxizilor acizilor grași mărind cantitatea radicalilor liberi inițiatori ai peroxidării. În toate cazurile hemoproteinele active se găsesc în stare oxidată, spre deosebire de Fe, la care schimbările de valență întovărășesc activitatea prooxidantă. În cazul hemoproteinelor adăugarea superoxid dismutazei nu inhibă efectul catalitic [85, 90].

Mecanismul prooxidant al compușilor hem este încă neclar. În urma reacției catalitice compusul hem este distrus aproximativ în funcție liniară de descompunerea peroxidului [45]. Produșii finali ai acțiunii prooxidante a compușilor hem sînt aldehide și cetone (grupări carbonil) cu maxim la 280 nm. În acțiunea prooxidantă a hemoproteinelor contează mult posibilitatea de difuzie, de realizarea unui contact strîns cu substratul lipidic. De aceea adăugarea unui agent emulsionant (Tween 20) mărește mult interacțiunea hemoproteină-acid gras și crește efectul prooxidant [70]. Interesant de menționat că, în timp ce superoxid dismutaza nu influențează efectul prooxidant al hemoproteinelor, în schimb inhibă eficient oxidarea catalizată de O_2^- a hemoglobinei în methemoglobină în prezența unor agenți hemolitici ca fenilhidrazina sau vitamina K_3 [53, 69].

Scanned with OKEN Scanner

dică din 1966, Barber [3] a fost de părere că peroxidarea acizilor graşi an ţesuturi este proporţională cu conţinutul lor în acid ascorbic. Deb ia după 10 ani această constatare a fost confirmată [79] pentru creier, iar alţi cercetători [23, 77] constată rolul de mediator al acidului ascorbic al peroxidării lipidelor în ţesuturi. Acest rol este posibil deoarece *in vitro*, acidul ascorbic stimulează peroxidarea lipidelor din membranele microzomiale [64] la concentraţii mici (10^{-5}—10^{-4}M) şi inhibă la concentraţii mai mari. Acest dublu aspect, observat şi în acţiunea prooxidantă a hemoproteinelor, deşi a întîrziat obţinerea unor concluzii, situează acest compus pe primul loc ca prooxidant în regnul animal deoarece concentraţiile fiziologice din ţesuturi sînt de acelaşi ordin cu cele necesare exercitării acestui rol [95].

Un factor ce întîrzie obţinerea unei concluzii clare este lipsa unui mecanism de acţiune. Acidul ascorbic se oxidează mai ales la *p*H alcalin iar la *p*H neutru este necesară intervenţia unei ascorbat oxidaze (E.C.1. 10.3.3) existentă în plante. Dar Green şi O'Brien [28] au demonstrat existenţa unei semidehidroascorbat reductaze în mitocondrii şi microzomi de ficat implicată în oxidarea NADH de către peroxizi lipidici. Pe de altă parte peroxidarea indusă de ascorbat produce o gamă de radicali liberi ce stimulează în continuare peroxidarea. Pederson şi Aust [64] au mărit şi mai mult confuzia prin demonstrarea incapacităţii superoxid dismutazei şi a 1,3-difenilisobenzofuran să inhibe specific peroxidarea lipidelor indusă de ascorbat. Acest fapt experimental sugerează un mecanism fără intervenţia $O_2^{\cdot-}$ şi a $^1O_2$. Oricare ar fi mecanismul de acţiune, acidul ascorbic stimulează peroxidarea acizilor graşi în combinaţie cu Fe^{2+} la concentraţii existente în ţesuturi şi în condiţii de asemenea posibile.

7.4.4. LIPOXIGENAZA

Lipoxigenaza sau lipoxidaza (E.C.1.13.11.12) a fost descoperită din necesităţi practice, pentru a se izola factorul peroxidant din făină şi din preparatele de carne. De-abia în 1952, Tappel [84] a stabilit identitatea lipoxigenazei cu caroten oxidază şi caracterul prooxidant enzimatic. Lucrînd pe o mare varietate de ţesuturi Tappel a arătat că lipoxigenaza nu se găseşte în ţesuturi animale, în schimb este larg răspîndită în regnul vegetal, mai ales în legume, cereale, fasole.

Lipoxigenaza catalizează oxigenarea unităţilor 1,4-*cis*, *cis*-pentadien ale acizilor graşi cu catenă lungă în 1-hidroperoxi-2,4-*trans*, *cis*-pentadien, conform fig. 7.3. Astfel de compuşi sînt aceiaşi acizi linoleic, linolenic şi arachidonic ce formează substratul cel mai peroxidabil şi în ţesuturile animale (Capitolul 3.1). Acizi înrudiţi structural (9-*trans*-12-octadecadienoic) cu configuraţie în *trans* sau mononesaturaţi nu sînt atacaţi sau chiar inhibă competitiv (acid oleic). Cinetica lipoxigenazei este încă neclarificată din cauza complexităţii reacţiei; enzima este activată de produsul reacţiei iniţial, apoi datorită legării puternice de centrul activ

Scanned with OKEN Scanner

(un atom de Fe) este inactivată reversibil [86]. Ecuația cinetică pentru concentrații mai mari de O_2 este de forma:

$$dO_2/dt = k'[\text{lipoxigenază}][\text{linoleat}]/K_M + [\text{linoleat}]$$

iar pentru concentrații mari de linoleat (mM) este de forma:

$$dO_2/dt = k''[\text{lipoxigenază}][O_2]/K_{MO_2} + [O_2]$$

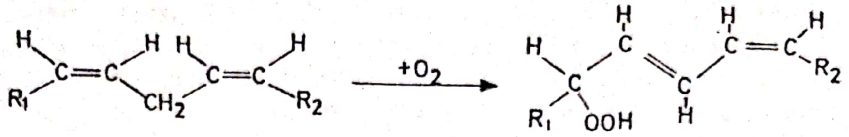


Fig. 7.3. Mecanismul reacției catalizate de lipoxigenază

Valorile constantelor cinetice sînt: K_M 25,0 μM, K_{MO_2} =30 μM, V_{max} = 18 μmol $min^{-1}mg^{-1}$ [24]. Lipoxigenaza în concentrații foarte mici (10^{-9}M), este inactivătă prin adezivitate de pereții vaselor. De asemenea, în cursul reacției normale (fig. 7.3.) se mai produce o reacție secundară prin oxidarea concomitentă a unor substanțe variate ca citocrom *c*, carotenoizi, colesterol, luminol, 1,3-difenilizobenzofuran, diclorfenolindofenol [38].

În ultimul timp s-a semnalat existența unor enzime în țesuturi animale ce seamănă în proprietăți cu lipoxigenaza, lucrînd pe aceiași acizi polinesaturați: în trombocite [56], reticulocite și mitocondrii [74], microzomi din testicul [72], leucocite polimorfonucleare [7]. Rolul lipoxigenazei din plante sau a enzimelor similare din celulele animale amintite pare a fi biosintetic, intervenind în formarea altor compuși cum ar fi prostaglandine [6], a cutinei la plante [84].

7.5. PEROXIDAREA LIPIDELOR ÎN PROCESE FIZIOLOGICE

Deocamdată dispunem de puține date privitor la implicarea peroxidării lipidelor (ca substratul cel mai favorabil) în procesele ce au loc fiziologic. Doar în cîteva, implicarea peroxidării este sigură.

7.5.1. METABOLIZAREA MEDICAMENTELOR

Microzomii hepatici sînt sediul principal al hidroxilării și altor transformări chimice a unor compuși străini organismului cum sînt medicamente, hidrocarburi cancerigene sau endogeni ca steroizi, acizi grași. Hidroxilarea este catalizată de un sistem enzimatic numit oxidazic cu funcții multiple și este format din citocrom P450, NADPH-citocrom P450 reductază și fosfatidilcolină [57, 89]. Citocromul P450, compusul principal al acestui sistem acționează și ca o peroxidază, catalizînd reducerea unor peroxizi lipidici sau steroidici la alcoolii respectivi în prezența unor donori de electroni cum sînt citocromul b_5, dimetilfenilendiamină sau medicamente ca aminopirina, dimetilanilina.

Scanned with OKEN Scanner

Mecanismele implicate în metabolizarea compușilor străini organismului în microzomii hepatici prin sistemul amintit sînt mult prea complexe pentru a fi prezentate aici [87]. În plus, cu toate numeroasele lucrări, încă nu este clară implicarea ramurii peroxidante din sistemul enzimatic microzomial. După cum arată De Matteis [14] există un vast material experimental în favoarea peroxidării lipidelor microzomiale în unele condiții în cursul metabolizării medicamentelor. O primă concluzie stabilită din vitezele de reacție este că hidroxilarea medicamentelor și peroxidarea lipidelor microzomiale sînt invers proporționale, datorită probabil competiției pentru O_2 necesar ambelor procese. O a doua concluzie este că în ambele procese se dezvoltă forme active ale O_2 cum sînt $O_2^{\cdot-}$ și $^1O_2$ [2, 87].

Sistemul oxidazic cu funcții multiple menționat este responsabil de procesul de detoxifiere hepatic, care începe prin introducerea unor grupări polare în structura substratului lipofil pentru a-l face mai hidrosolubil. Sistemul enzimatic microzomial cuprinde de asemenea un număr de reacții oxidative ca hidroxilări, *O* și *N*-dealchilări, sulfoxidări [89]. Conform deci primei scheme din fig. 7.4. A, reacția principală de hidroxilare a unui substrat *AH* se datorește contactului direct cu citocromul P450 redus datorită unui flux de electroni primit de la NADPH prin intermediul celorlalți transportori intermediari. Acești transportori puși *in vitro* în prezența unor acceptori de electroni cu afinitate mai mare pot „șunta" și deversa fluxul de electroni în alte reacții [63, 74].

Reacția de hidroxilare poate fi prezentată și sub forma din fig. 7.4. B, în care se arată mai clar componenții și se indică peroxidarea ca o ramură competitivă cu desaturarea sau *N*- și *O*-dealchilarea [57]. Bidlack și Hochstein [5] prezintă o schemă (fig. 7.4. C) în care se ține seama de proprietățile de peroxidază ale hemoproteinelor din sistem (citocromi P450 și b_5), cît și de condițiile în care apare peroxidarea lipidelor microzomiale: Fe^{3+} liber, dar mai ales complexat cu ADP sau pirofosfat.

Indiferent care ar fi mecanismul, în anumite condiții încă neclare *in vivo*, poate apărea o peroxidare a lipidelor microzomiale din ficat. Mecanismul cel mai probabil s-ar datora structurii hemoproteinice a componenților sistemului microzomial, capacității lor de a acționa ca peroxidază. Producerea unor specii reactive, fie prin activarea O_2 ($^1O_2$), ori prin peroxizi (H_2O_2 sau lipidici), este sigură datorită chemiluminiscenței ce întovărășește hidroxilarea microzomială *in vitro* [55, 57]. După O'Brien [57], O_2 și citocromul P450 sînt componenți comuni ambelor procese și pot realiza hidroxilarea unor medicamente. Ramura peroxidantă, deși este mai simplă căci nu necesită prezența celorlalți citocromi, produce totuși distrugerea citocromului P450. O dovadă suplimentară a posibilității peroxidării lipidelor microzomiale este furnizată de creșterea acestui proces în urma iradierii cu radiații ionizante [43, 91].

Consecințele predominării ramurii peroxidante *in vivo* sînt deocamdată ipotetice. În primul rînd, după cum s-a menționat, ne putem aștepta la o micșorare a metabolizării unor medicamente ca urmare a folosirii O_2 și citocromului P450 pentru peroxidare. În al doilea rînd, vor apărea o serie de produși toxici deja observați în intoxicații cronice (alcoolism) sau acute (tetraclorură de carbon, Capitolul 10). Incubarea unei suspensii de microzomi plus factorii necesari peroxidării cu o suspensie de hematii produce în scurt timp o hemoliză completă [92]. Peroxizii organici pot

Scanned with OKEN Scanner

substitui NADPH şi O_2 în unele hidroxilări modificînd biosinteza hepatică a unor compuşi cum sînt acizii biliari [12]. Modificări minore ale membranelor microzomiale, aşa cum se produc în intoxicări cronice cu solvenţi organici sau metale grele, pot crea condiţii pentru creşterea ponderii ramurii peroxidante a sistemului de transport electronic microzomial.

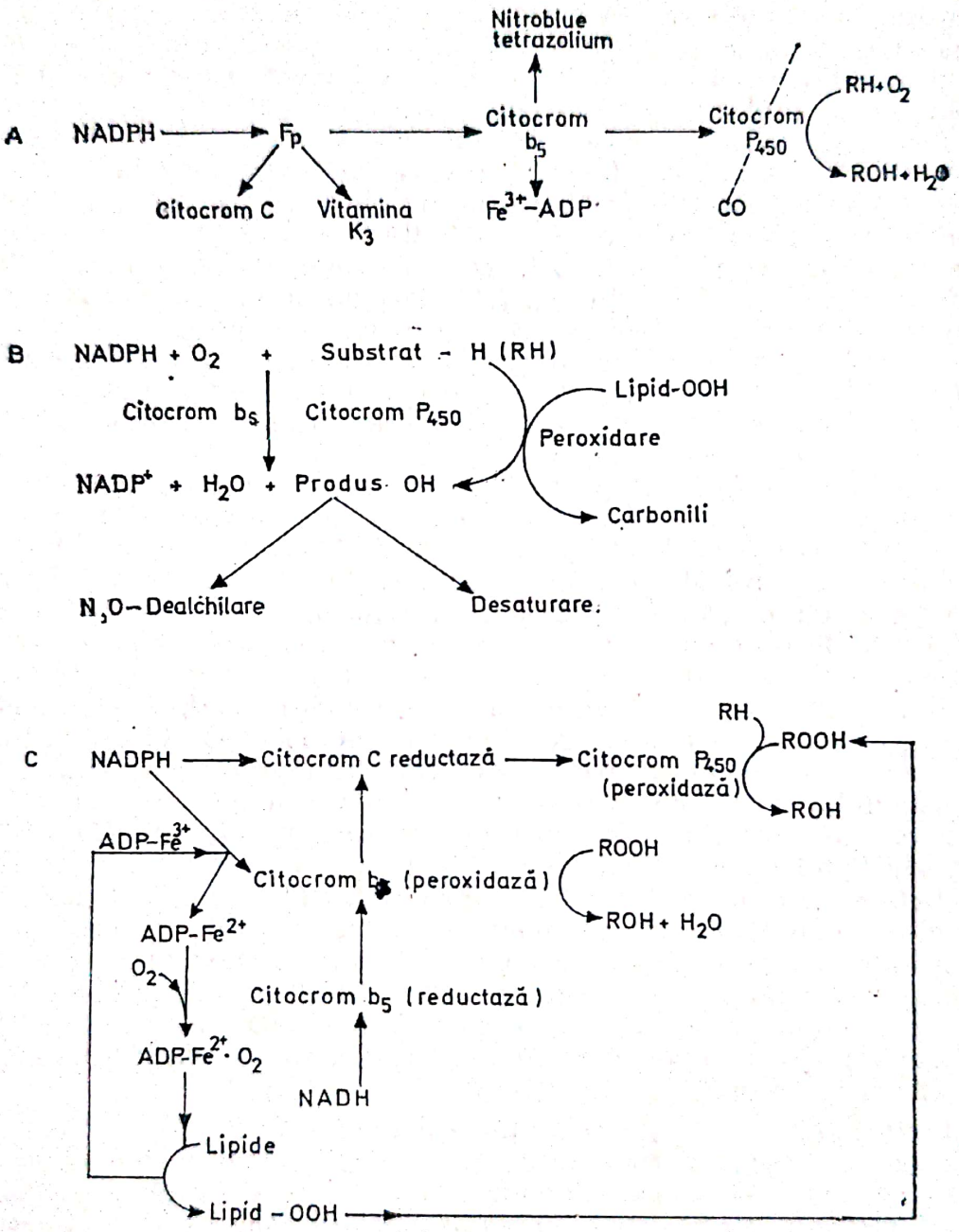


Fig. 7.4. Sistemul hidroxilant microzomial A. Hidroxilarea unor substanţe (*RH*) şi conectarea sistemului cu alţi acceptori de electroni. B. Legăturile dintre hidroxilare, reacţiile asociate şi peroxidare. C. Schema ipotetică a hidroxilării prin capacitatea peroxidazică a citocromilor P450 şi b_5 (după Bidlack [5]).

Scanned with OKEN Scanner

7.5.2. PROSTAGLANDINE

Prostaglandinele sînt o clasă de substanţe derivînd din acizii graşi nesaturaţi (arachidonic) care acţionează asupra muşchilor netezi, metabolismului lipidic şi transportului prin membrană. Aceşti compuşi apar în cantităţi mari (10^{-5}M) în lichidul seminal şi în concentraţii mici (10^{-9}M) în diferite ţesuturi ca plămîn, creier, rinichi, intestin etc. Stimularea nervoasă sau administrarea unor medicamente eliberează prostaglandine în sînge la un nivel variabil între 10^{-8}—10^{-10} M [25, 89]. Prostaglandinele pot fi privite ca hormoni tisulari avînd unele avantaje asupra catecolaminelor. În timp ce acestea din urmă acţionează la nivelul concentraţiilor de 10^{-6} M, trebuiesc depozitate şi au o biosinteză mai lungă [25], prostaglandinele acţionează în concentraţii de 10^{-9} M şi au o cale biosintetică scurtă putînd fi formate în funcţie de necesităţi.

Acidul arachidonic provenit din fosfolipidele componente ale membranelor trombocitelor formează principala sursă pentru biosinteza prostaglandinelor. Sînt implicate fosfolipidele ce conţin lecitină (70%), fosfatidil inositol (25%) şi fosfatidil serină (5%), dar mai pot interveni triacil gliceroli (ţesut adipos) şi esteri ai colesterolului (suprarenală şi ovariană). Fosfolipaza A_2 este enzima responsabilă de catalizarea scindării acidului arachidonic din poziţia 2 a lecitinei. Fosfolipazele se împart la rîndul lor în cele de tipul I, legate de membrană şi stimulate de Ca^{2+} şi cele de tipul II, solubile, inhibate de Ca^{2+} reprezentînd forma activă. Fosfolipazele A_2 au fost izolate din splină, suprarenală, macrofage [22] şi sînt inhibate de unele medicamente antiinflamatoare. Încă nu este clar care sînt factorii de tip polipeptidic care stimulează activarea fosfolipazelor. Aceşti factori de tipul bradikininei sînt supuşi unui control de tip feed-back negativ de către produsul final, prostaglandinele.

Etapa următoare a biosintezei prostaglandinelor este foarte complexă deoarece implică acţiunea mai multor enzime înglobate sub denumirea de prostaglandin sintetază şi formarea intermediară a mai multor endoperoxizi. În fig. 7.5 este prezentat mecanismul acceptat [25] pentru conversia acidului arachidonic (5,8,11,14-eicosatetetraenoic) în prostaglandine. Într-o primă reacţie, stereospecifică, se elimină un atom de hidrogen de la C_{13} urmată de introducerea O_2 la C_{11} şi formarea derivatului 11-peroxi. Urmează formarea unor peroxizi ciclici în urma adiţiei O_2 la C_{15}, izomerizarea dublei legături de la C_{12} şi un atac al $^1O_2$ la C_9. Atomii de oxigen din poziţiile C_9 şi C_{11} provin din aceeaşi moleculă O_2[73, 95]. Atît captatorii specifici formelor singlet sau superoxid [24, 96], cît şi antioxidanţi obişnuiţi (BHA sau BHT) inhibă biosinteza prostaglandinelor [13], iar unii peroxizi intermediari prezintă reacţia tipică pentru malonic dialdehidă. După cum se observă în fig. 7.5 endoperoxizii constituie compuşii cheie pentru orientarea diferitelor căi biosintetice. Dealtfel aceşti endoperoxizi acţionează ca atare producînd agregarea trombocitelor şi contracţia muşchilor netezi veziculari (42). Atît endoperoxizii cît şi produşii înrudiţi, tromboxani şi prostacicline, posedă multe din proprietăţile prostaglandinelor, care probabil acţionează şi prin aceşti compuşi. Un mare obstacol în cunoaşterea produşilor şi a proprietăţilor intermediarilor se datoreşte extremei instabilităţi a tuturor acestor compuşi. O altă greutate se datoreşte acţiunii unor factori variaţi ce pot modifica biosinteza prostaglandi-

Scanned with OKEN Scanner

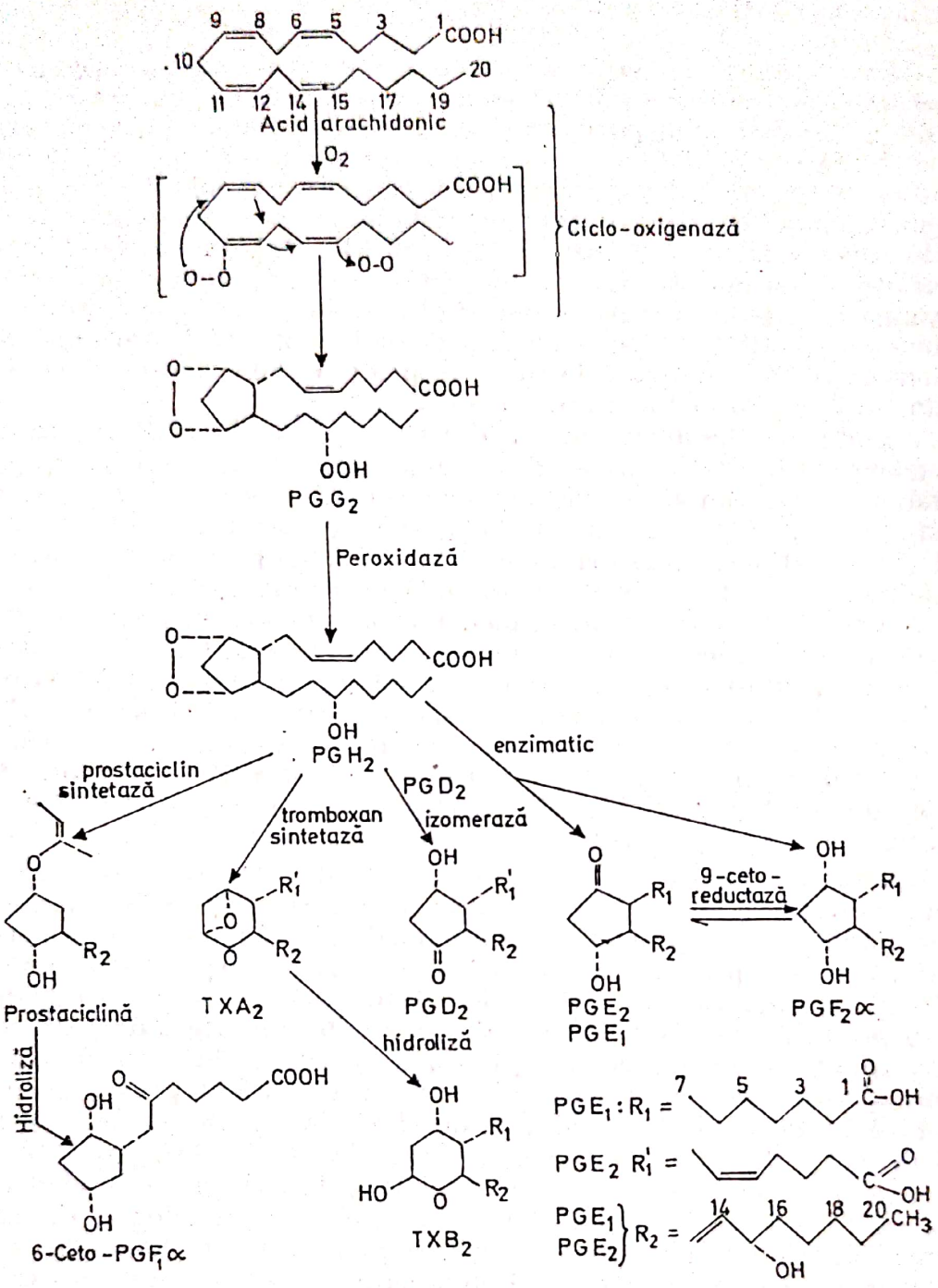


Fig. 7.5. Schema biosintezei prostaglandinelor și a compușilor înrudiți. După [25] și [96]

nelor. Astfel glutationul redus și alți compuși tiolici sînt cofactori ai reacției catalizate de prostaglandin endoperoxid *E* izomerază [58], dar inhibă alte etape ale biosintezei cum ar fi reacția de oxigenare [59]. Antioxidanții cunoscuți și ioni metalici ca Cu^{2+}, Zn^{2+}, Cd^{2+} inhibă procesul biosintetic la nivele diferite [67]. Acizi grași polinesaturați ca oleic, linoleic, linolenic cu 18 atomi de carbon constituie de asemenea inhibitori

Scanned with OKEN Scanner

competitivi. În al treilea rînd s-au observat mari diferenţe în capacitatea sintetizantă între diferite ţesuturi ce par a fi legate de uşurinţa peroxidării nespecifice a lipidelor. Astfel Robak şi Sobanska [71] au observat că cele două procese decurg paralel în medulosuprarenală, plămîni şi splină în schimb diferă în corticosuprarenală, creier şi rinichi.

Reacţia catalizată de ciclo-oxigenază foloseşte O_2 (probabil activat) şi generează radicali liberi, caracterizîndu-se şi printr-o gamă largă de substanţe ce o inhibă. Astfel de substanţe sînt nelegate structural şi cuprind antioxidanţi, medicamente antiinflamatorii de tipuri diferite (aspirină, fenamaţi, indometacin, sulindac) şi psihotropice ca fenilalchilamine şi indolalchilamine. După cum au arătat recent cercetătorii japonezi [58] există o mare confuzie între preparatele enzimatice extrase şi proprietăţile atribuite. Ei susţin că în realitate prostaglandin endoperoxid sintetaza este o singură enzimă ce prezintă activităţi de ciclo-oxigenază şi de hidroperoxidază. Această enzimă necesită pentru activare prezenţa unei hemoproteine şi este stabilizată de triptofan, fiind în multe proprietăţi asemănătoare triptofan oxigenazei [61, 42].

Modificări patologice în biosinteza prostaglandinelor au fost invocate în explicarea inflamaţiilor, dermatitelor, migrenei etc. [42, 89].

7.5.3. AGREGAREA TROMBOCITELOR

Agregarea reprezintă principala funcţie fiziologică prin care trombocitele participă la hemostază. Trombina, fagocitoza şi anticorpii antitrombocitari sînt probabil agenţii cei mai răspîndiţi în producerea agregării. Alţi agenţi ca ADP, colagen, adrenalina sînt mai puţin eficienţi. În timpul agregării membranele plasmatice şi granulare ale trombocitelor sînt alterate în grad diferit oferind condiţii peroxidării lipidelor. Asocierea peroxidării cu agregarea trombocitelor a fost demonstrată experimental [81] şi are drept consecinţă eliberarea enzimelor hidrolitice din lizozomi. În ultimii ani s-a arătat că agregarea trombocitelor este un proces complex, cu mai multe faze prezentate schematic în fig. 7.6.

Din fig. 7.6. se observă că în urma ruperii capilarelor se produce o creştere a adezivităţii trombocitelor în special faţă de colagen urmată de o agregare primară şi de un proces de eliberare a unor substanţe ca ADP, trombină, catecolamine ce produc o a doua agregare mai mare [42].

Încă în timpul primei etape, de creştere a adeziunii trombocitelor se produce eliberarea acidului arachidonic din fosfolipide sub acţiunea fosfolipazelor A_2 (secţia precedentă 7.5.2). Acidul arachidonic ca atare poate produce modificări ale membranei şi o primă agregare probabil prin peroxidare [41]. În continuare acidul arachidonic devine substrat pentru biosinteza prostaglandinelor furnizînd în primul rînd o serie de endoperoxizi ce pot acţiona ca atare, sub formă de prostaglandine sau de compuşi înrudiţi tromboxani. Endoperoxizii induc faza de eliberare şi au fost denumiţi factorul *LASS (Labile Aggregation Stimulating Substance)*. În timp ce aspirina inhibă formarea endoperoxizilor şi deci prima reacţie de eliberare, nu mai acţionează asupra celei de a doua reacţii de eliberare a hidrolazelor din granule de tip α [22].

Scanned with OKEN Scanner

Dealtfel, în trombocite, biosinteza prostaglandinelor prezintă o particularitate în sensul existenţei unei a doua căi catalizată de o lipoxigenază cu formare de acid hidroxieicosatetraenoic (HETE), fig. 7.7. Între pacienţii cu inflamaţii majore s-a găsit o mare variaţie în ponderea celor două căi [31]. Oricum noile date despre rolul endoperoxizilor au schimbat mult stadiul cunoştinţelor despre prostaglandine şi biochimia procesului inflamator (Capitolul 10.5), deoarece multe din proprietăţile prostaglandinelor se datoresc endoperoxizilor [22, 47]. Astfel doi

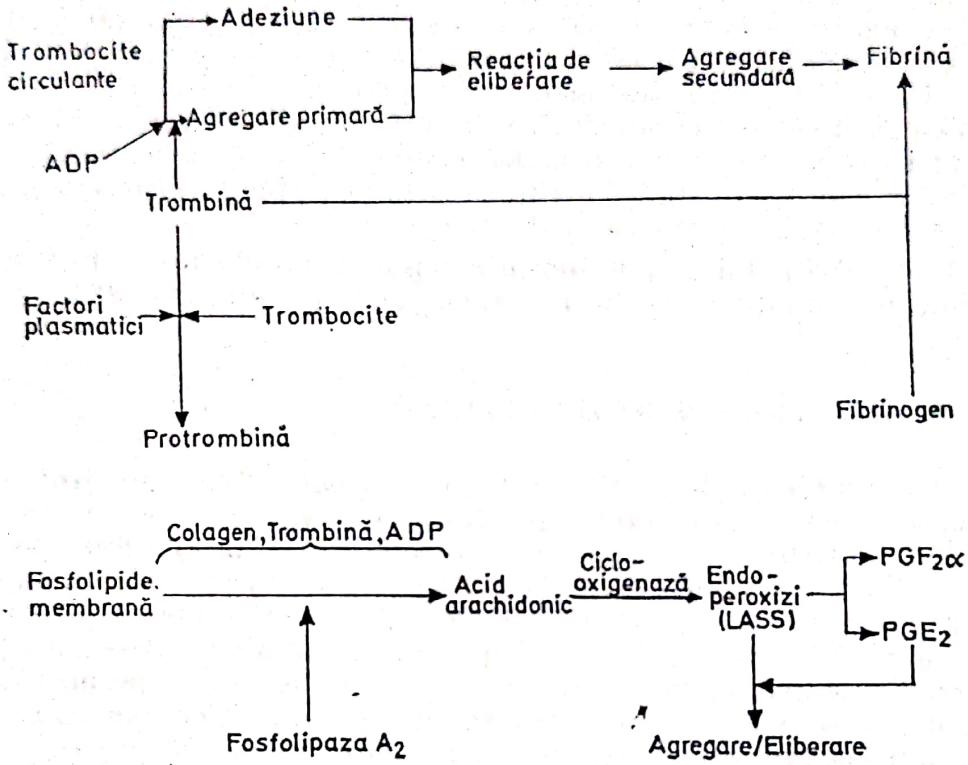


Fig. 7.6. Secvenţa reacţiilor implicate în procesul de agregare al trombocitelor. Sus : Conexiunea agregării cu formarea chiagului de fibrină Jos : Implicarea endoperoxizilor în agregare

endoperoxizi, PGG_2 şi PGH_2, produc o agregare rapidă şi ireversibilă a trombocitelor. Agregarea indusă de PGG_2 este întovărăşită de eliberare de ADP şi serotonină, şi comparativ mult mai rapidă şi mai puternică decît cea indusă de ADP. Indometacina, un inhibitor al biosintezei prostaglandinelor, inhibă reacţia de eliberare indusă de colagen sau ADP, dar nu are efect asupra celei induse de PGG_2 [25].

Agenţii ce produc agregarea (trombina, colagen, ADP, adrenalina) pe lîngă inducerea reacţiei de eliberare, stimulează formarea altui endoperoxid PHD şi a produsului final al căii catalizate de lipoxigenază HETE. Dealtfel după cum se observă în fig. 7.7, PGG_2 este un compus cheie în biosinteza prostaglandinelor, tromboxanilor şi prostaciclinelor. Reglarea acestui proces biosintetic complex, „în cascadă", trebuie să se

Scanned with OKEN Scanner

producă la mai multe nivele. Un prim nivel este etapa de eliberare a acidului arachidonic din fosfolipide, care datorită vitezei mici de reacţie va limita mult întreg procesul biosintetic. A doua etapă regulatorie este cea catalizată de ciclo-oxigenază inhibată de medicamente antiinflamatorii, antioxidanţi, glutation peroxidază, Cu^{2+} şi agenţi sulfhidrilici ca mercaptoetanol, dithiotreitol şi dietilditiocarbamat. În schimb alţi compuşi tiolici ca cisteina, glutationul redus şi DL-penicilamina potenţează agregarea trombocitelor [88]. Acţiunea compuşilor tiolici, a glutation peroxidazei

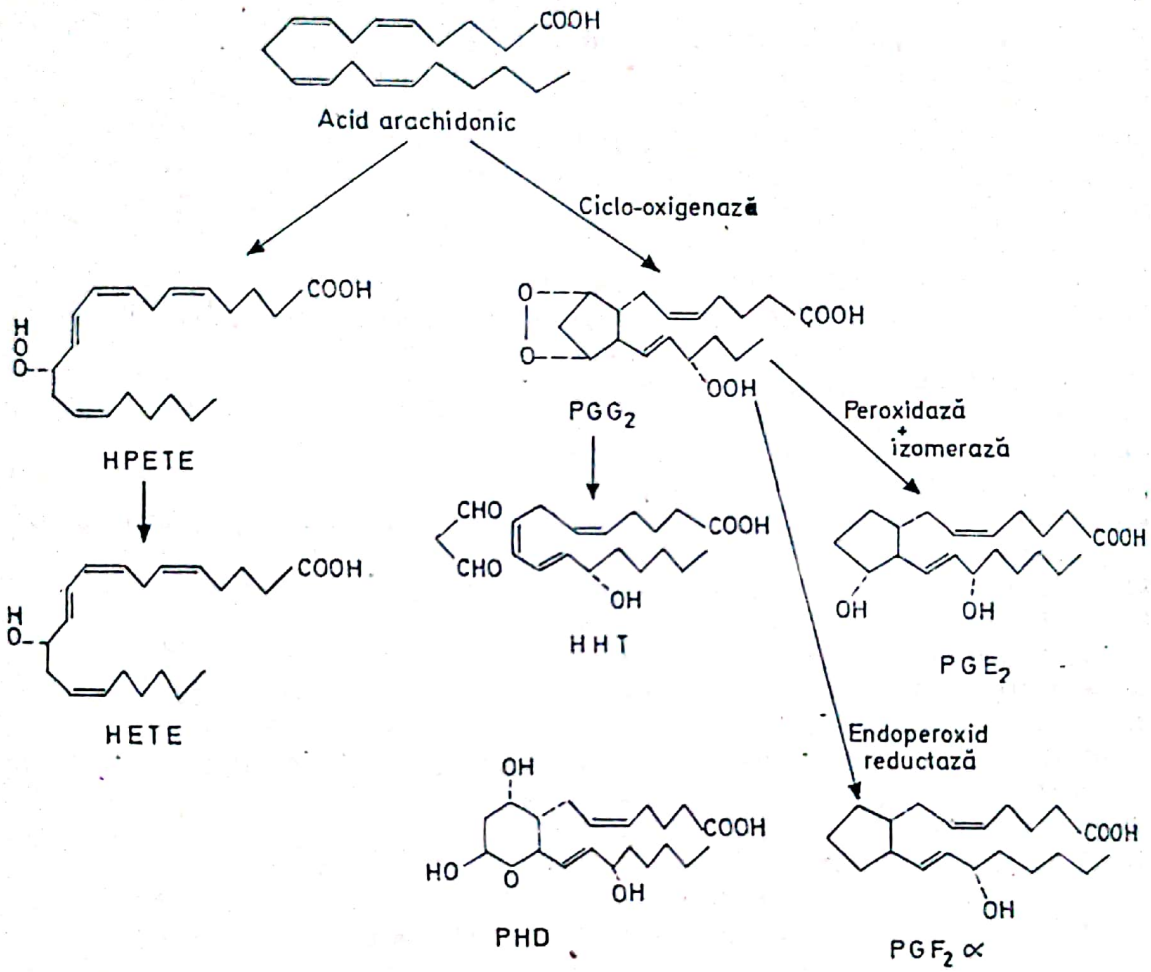


Fig. 7.7. Biosinteza prostaglandinelor şi a compuşilor înrudiţi în trombocite. După Malmsten [47].

şi catalazei sugerează implicarea unor radicali liberi şi a H_2O_2 generaţi în cursul autooxidării aminotiolilor.

Un alt nivel de reglare îl constituie însăşi endoperoxizii şi prostaglandinele neoformate, cu proprietăţi, în unele cazuri, contradictorii. Astfel PGD_2 este inhibitor al agregării trombocitelor, iar PGE_2 şi $PGF_2\alpha$ au proprietăţi antagoniste; PGE_2 este vasodilatator, iar $PGF_2\alpha$ este vasoconstrictor. Raportul PGE/PGF pare să constituie un alt control.

Tromboxanii provin tot din endoperoxizi ca PGG_2 şi se caracterizează prin instabilitate, inducerea agregării şi vasoconstricţie [25, 42].

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE

1. P. H. ABELSON, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **69**, 276 (1957).
2. G. AUCLAIR, M. C. LECOMTE, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **85**, 946 (1978).
3. A. A. BARBER, *Lipids*, **1**, 146 (1966).
4. L. V. BERKNER, L. C. MARSHALL, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **53**, 1215 (1965).
5. W. R. BIDLACK, P. HOCHSTEIN, *Life Sci.*, **14**, 2003 (1975).
6. G. S. BILD, G. N. BHAT, *J. Biol. Chem.*, **253**, 21 (1978).
7. P. BORGEAT, M. HAMBERG, B. SAMUELSSON, *J. Biol. Chem.*, **251**, 7916 (1976).
8. A. BOVERIS, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **78**, 67 (1977).
9. J. CADET, R. TEOULE, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 661 (1978).
10. B. D. CHESON, T. T. CURNUTTE, *Progr. Clin. Immunol.*, **3**, 1 (1977).
11. G. COHEN, R. HEIKKILA, *J. Biol. Chem.*, **249**, 2447 (1974).
12. H. DANIELSSON, K. WIKVALL, *FEBS Lett.*, **66**, 299 (1976).
13. C. DEBY, *Arch. Int. Phys. Biochem.*, **84**, 867 (1976).
14. F. DE MATTEIS, N. N. ALDRIDGE, „Heme and Hemoproteins", Springer Verlag Berlin, cap. 4, 1978.
15. D. B. FISHER, S. KAUFMAN, *J. Biol. Chem.*, **248**, 4300 (1973).
16. K. L. FONG, P. B. MC CAY, J. L. POYER, *Chem. Biol. Interact.*, **15**, 77 (1976).
17. C. S. FOOTE, S. WEXLER, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 3879 (1964).
18. I. FRIDOVICH, *J. Biol. Chem.*, **245**, 4053 (1970).
19. I. FRIDOVICH, *Annu. Rev. Biochem.*, **44**, 147 (1975).
20. I. FRIDOVICH, *Bioscience*, **27**, 462 (1977).
21. I. FRIDOVICH, *Science*, **201**, 875 (1978).
22. C. GALLI, G. PARCELOTTI, „Phospholipases and Prostaglandins", Raven Press New York, 1978.
23. A. K. GAZDUNOV, I. N. LESHKOSNOEVNA, *Biofizika*, **23**, 391 (1978).
24. M. J. GIBIAN, R. A. GALAWAY, *Biochemistry*, **15**, 4209 (1976).
25. K. C. GIBSON, *Chem. Soc. Rev.*, **6**, 489 (1977).
26. K. GODA, J. W. CHU, A. P. SCHOOP, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **52**, 1300 (1973).
27. S. A. GOSEIN, I. FRIDOVICH, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **153**, 778 (1977).
28. R. C. GREEN, P. J. O'BRIEN, *Biochim. Biophys. Acta*, **293**, 334 (1973).
29. B. HALLIWELL, *Eur. J. Biochem.*, **55**, 355 (1975).
30. B. HALLIWELL, *FEBS Lett.*, **92**, 321 (1978).
31. M. HAMBERG, B. SAMUELSSON, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**, 1446 (1975).
32. G. HAMILTON, R. D. LIBBY, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **55**, 33 (1973).
33. O. HAYAISHI, K. ASADA, „Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen" University Park Press, Baltimore, 1977.
34. W. HEINEMANN, B. A. SWINGEN, *Z. Lebens Unter. Forsch.*, **78**, 167 (1978).
35. F. HIRATA, O. HAYAISHI, *J. Biol. Chem.*, **250**, 5960 (1975).
36. L. G. HORWELL, S. G. MAYHEW, G. P. FROST, *J. Biol. Chem.*, **244**, 3999 (1969).
37. R. M. KASCHNITZ, Y. HATEFI, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **171**, 292 (1975).
38. C. O. KEDIAHI, *Agricult. Biol. Chem.*, **41**, 2369 (1977).
39. E. F. KELLOG, I. FRIDOVICH, *J. Biol. Chem.*, **250**, 8812 (1975).
40. T. KIDO, K. SODA, K. ASADA, *J. Biol. Chem.*, **251**, 6994 (1976).
41. R. L. KIMLAERGH, H. J. JERMERS, M. A. PACKMAN, *Science*, **194**, 1011 (1976).
42. N. KORASCH, J. FRIED, „Biochemical Aspects of Prostaglandins", Academic Press, New York, 1977.
43. R. LATARJET, B. E. KERT, P. DEMERSEN, *Rad. Res. Suppl.*, **3**, 247 (1965).
44. S. E. LEWIS, E. D.WILLS, *Biochim. Biophys. Acta*, **70**, 336 (1963).

Scanned with OKEN Scanner

45. W. O. LUNDBERG, „Autoxidation and Antioxidants", vol. I, Interscience, New York, p. 325, 1961.
46. H. I. MAGER, W. BERENDS, *Biochim. Biophys. Acta*, **118**, 440 (1966).
47. C. MALMSTEN, M. HAMBERG, B. SAMUELSSON, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **72**, 1446 (1975).
48. N. A. MILAS, R. S. HARRIS, A. GOLUBOVIC, *Rad. Res. Suppl.*, **3**, 71 (1965).
49. H. P. MISRA, I. FRIDOVICH, *J. Biol. Chem.*, **246**, 6886 (1971).
50. H. P. MISRA, I. FRIDOVICH, *J. Biol. Chem.*, **247**, 188 (1972).
51. H. P. MISRA, I. FRIDOVICH, *J. Biol. Chem.*, **247**, 6960 (1972).
52. H. P. MISRA, *J. Biol. Chem.*, **249**, 2151 (1974).
53. T. MIURA, N. OGAWA, T. OGESO, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 1261 (1978).
54. K. NICHOLAS, G. P. GASIC, W. E. BARNETTE, *Angew. Chemie*, **17**, 293 (1978).
55. R. NILSSON, Thesis, University of Stockholm, 1969.
56. D. H. NUTGREN, *Biochim. Biophys. Acta*, **380**, 299 (1975).
57. P. J. O'BRIEN, *Pharm. Therap.*, **2**, 517 (1978).
58. N. OGINO, S. OHKI, O. HAYAISHI, *J. Biol. Chem.*, **253**, 5061 (1978).
59. S. OHKI, N. OGINO, O. HAYAISHI, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **74**, 144 (1977).
60. R. OLINESCU, *Rev. Roum. Biochim.*, **8**, 55 (1971).
61. R. OLINESCU, E. PASCU, *Rev. Roum. Biochim.*, **12**, 233 (1975).
62. J. OZOLS, *Annals Clin. Res., Suppl.*, **17**, 182 (1976).
63. T. C. PEDERSON, S. A. AUST, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **52**, 1071 (1973).
64. T. C. PEDERSON, S. A. AUST, *Biochem. Pharmacol.*, **23**, 2467 (1974).
65. S. K. PENG, C. B. TAYLOR, B. MIKELSON, *Arch. Pathol., Lab. Med.*, **102**, 57 (1978).
66. C. PONNAMPERUNA, A. SHIMOYAMA, M. YAMADA, *Science*, **197**, 456 (1977).
67. G. H. RAO, J. M. GERARD, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 845 (1978).
68. A. RAHMITULA, P. J. O'BRIEN, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **62**, 268 (1975).
69. H. R. RAWLS, P. J. VAN SANTEN, *Anal. N.Y. Acad. Sci.*, **171**, 135 (1970).
70. K. S. RHEE, *J. Food. Sci.*, **43**, 6 (1978).
71. J. ROBAK, B. SOBASKA, *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 2233 (1976).
72. I. SAHLIN, S. GRASMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, **243**, 300 (1978).
73. B. SAMUELSSON, *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 3011 (1965).
74. T. SCHEWE, W. HALANGK, S. M. RAPOPORT, *FEBS Lett.*, **60**, 149 (1975).
75. G. SCHOLES, J. WEISS, C. M. WHEELER, *Nature*, **178**, 157 (1956).
76. J. W. SCHOPF, *Scient. American*, **239**, 84 (1978).
77. A. SEREGI, A. SCHAEFER, *Experientia*, **34**, 1056 (1978).
78. D. R. SHANKLIN, „Perspectives in Biology and Medicine", 13, 80 (1969).
79. D. P. SHARMA, C. R. MURTI, *J. Neurochem.*, **27**, 299 (1976).
80. S. G. SLIGAR, J. D. LIPSCOMB, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **61**, 290 (1974).
81. J. B. SMITH, C. M. INGERMAN, M. J. SILVER, *J. Lab. Clin. Med.*, **88**, 167 (1976).
82. L. L. SMITH, J. P. STRAND, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 479 (1978).
83. B. A. SWINGEN, F. O. O'NEIL, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 803 (1978).
84. A. L. TAPPEL, *J. Food Res.*, **17**, 550 (1952).
85. A. L. TAPPEL, *The Enzymes*, **8**, 275 (1963).
86. M. J. THOMAS, K. SMEHL, W. A. PRYOR, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **83**, 927 (1978).
87. V. ULRICH, I. ROOTS, R. HILDEBRANDT, R. ESTABROOK, A. H. CONNEY „Microsomes and Drug Oxidations", Pergamon Press, New York, 1977.

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 8

PROCESE BIOCHIMICE ÎN CARE SE FORMEAZĂ H_2O_2

Cu excepţia biosintezei prostaglandinelor şi într-o oarecare măsură a hidroxilării microzomiale, formarea peroxizilor lipidici în mod fiziologic este evitată datorită sistemelor de protecţie (Capitolul 9). În schimb H_2O_2, peroxidul de hidrogen, se formează fiziologic ca urmare a proceselor de oxidoreducere celulare. Datorită instabilităţii sale, a eficienţei sistemelor protectoare şi a relativei ineficienţe a metodelor de măsurare se ştie încă prea puţin despre formarea şi rolul H_2O_2. După Aebi [1] producerea metabolică a H_2O_2 ar fi între 1—10 mM per kg ţesut umed per oră, care deşi aproximativă sugerează totuşi amploarea formării acestui peroxid ca produs secundar al oxidărilor biochimice.

8.1. REDUCEREA O_2

În Capitolul 1 (1.1.) s-a arătat că restricţia de spin din structura O_2 constituie o barieră pentru reducerea bivalentă a O_2 şi că în medii biologice aceasta se realizează fie prin combinarea O_2 cu un ion al metalelor de tranziţie paramagnetic (Fe, Cu) din oxidaze, ori reducerea univalentă cu producere de O_2^- şi $OH^\cdot$ (Capitolul 1.3—5).

Deşi H_2O_2 este un oxidant puternic, datorită structurii particulare a O_2 (Capitolul 1.1.) reacţiile în care este implicat sînt surprinzător de încete. Atît peroxidul de hidrogen, H_2O_2, cît şi anionul său HO_2^- sînt nucleofili puternici şi în anumite condiţii prezintă o reactivitate mare [33]. În schimb în alte reacţii ale H_2O_2, agentul activ este radicalul $OH^\cdot$ produs prin scindarea legăturii O—O datorită căldurii, luminii sau prezenţei ionilor metalici (Capitolele 3.3 şi 7.4).

8.1.1. EFECTUL IONILOR METALELOR DE TRANZIŢIE

După cum s-a arătat la descrierea prooxidanţilor (3.3 şi 7.4), ionii metalelor de tranziţie (Fe, Cu, Co) exercită un efect puternic asupra formării şi descompunerii peroxizilor, atît liberi cît şi complexaţi cu EDTA, ADP sau fosfat, probabil pentru menţinerea solubilităţii. H_2O_2 reacţionează mult mai uşor cu aceşti ioni metalici decît cu substanţe organice şi acţiunea multor metaloenzime se încadrează în această reacţie.

Acţiunea catalizatoare a ionilor metalici se încadrează în jurul reacţiei de dismutare a superoxidului $O_2^{\cdot-}$. Această reacţie, ce va fi discutată mai pe larg în Capitolul 9, are forma reacţiei (1) şi este catalizată

$$2\,O_2^{\cdot-} + 2H^+ \longrightarrow O_2 + H_2O_2 \qquad (1)$$

Scanned with OKEN Scanner

de superoxid dismutază. Reacţia se produce pe o scară largă de *p*H şi cuprinde şi alte reacţii asociate cum sînt :

$$O_2^{\cdot-} + HO_2^- \searrow \quad k = 8{,}5 \cdot 10^7\ M^{-1}\ s^{-1}$$

$$\text{O}_2\text{HO}_2^- \xrightarrow{H^+} O_2 + H_2O_2$$

$$2\,O_2^{\cdot-} + H^+ \nearrow \quad k = 1{,}0 \cdot 10^2\ M^{-1}\ s^{-1}$$

$$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + H^+ \longrightarrow HO_2^- + O_2 \quad k = 7{,}6 \cdot 10^5\ M^{-1}\ s^{-1}$$

Ţinînd seama că $O_2^{\cdot-}$ pare să fie un compus intermediar în foarte multe reacţii redox [42], apariţia de asemenea intermediară a H_2O_2 pare verosimilă. Reacţia de dismutare este catalizată de superoxid dismutază ce conţine ioni metalici (Fe, Mn, Zn), dar şi ioni metalici liberi sau complexaţi, cei mai activi fiind Fe^{2+} şi Cu^{2+} conform reacţiilor :

$$O_2^{\cdot-} + Me^{n+} \longrightarrow Me^{(n-1)} + O_2 \qquad (2)$$

$$Me^{(n-1)} + O_2^{\cdot-} + 2\,H^+ \longrightarrow Me^{n+} + H_2O_2 \qquad (3)$$

$$O_2^{\cdot-} + Fe^{2+} - EDTA + 2\,H^+ \longrightarrow Fe^{3+} - EDTA + H_2O_2 \qquad (4)$$

Recent Halliwell [42] şi Mc Cord şi Day [64] au arătat că în medii biologice va fi o competiţie între aceste reacţii şi cele de descompunere a H_2O_2 catalizate de aceiaşi ioni metalici şi în aceleaşi condiţii. Reacţiile de descompunere a H_2O_2 sînt diferite variante ale binecunoscutei reacţii Haber-Weiss (Capitolul 1.5) de forma ecuaţiei (8) :

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^- \qquad (5)$$

$$O_2^{\cdot-} + Fe^{3+}\text{—EDTA} \longrightarrow O_2 + Fe^{2+}\text{—EDTA} \qquad (6)$$

$$Fe^{2+}\text{—EDTA} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+}\text{—EDTA} + OH^{\cdot} + OH^- \qquad (7)$$

$$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^{\cdot} + OH^- \qquad (8)$$

Halliwell [42] a dedus experimental că reacţiile 2—4 sînt mai favorabile decît 5—8 şi că complexul Fe—EDTA funcţionează ca o superoxid dismutază prin reacţiile (4) şi (7). Astfel $O_2^{\cdot-}$ şi H_2O_2 competiţionează pentru complex şi reacţia globală Haber-Weiss (8) devine eficientă cu cît se acumulează H_2O_2. Astfel Mc Cord şi Day [64] au găsit pentru concentraţii de 5 μM Fe, 10 μM H_2O_2, o formare de 3,2 nmol/minut $O_2^{\cdot-}$ şi că pentru un mol de $O_2^{\cdot-}$ se formează 0,075 radicali $OH^{\cdot}$. Eficienţa reacţiei Haber-Weiss variază însă foarte mult în funcţie de condiţiile experimentale şi în special de prezenţa catalazei şi a superoxid dismutazei.

Recent [52, 74] reacţiile (2—4) au fost demonstrate experimental prin peroxidarea linoleatului de complexul Fe—EDTA, cît şi de H_2O_2 generat de sistemul NADPH-citocrom P450-reductază microzomial. Se

Scanned with OKEN Scanner

confirmă astfel experimentele lui Root și colaboratorii după care H_2O_2 poate difuza prin membranele biologice [76] unde poate forma radicali $OH^{\cdot}$ conform reacțiilor (5—8) ce pot iniția peroxidarea acizilor grași

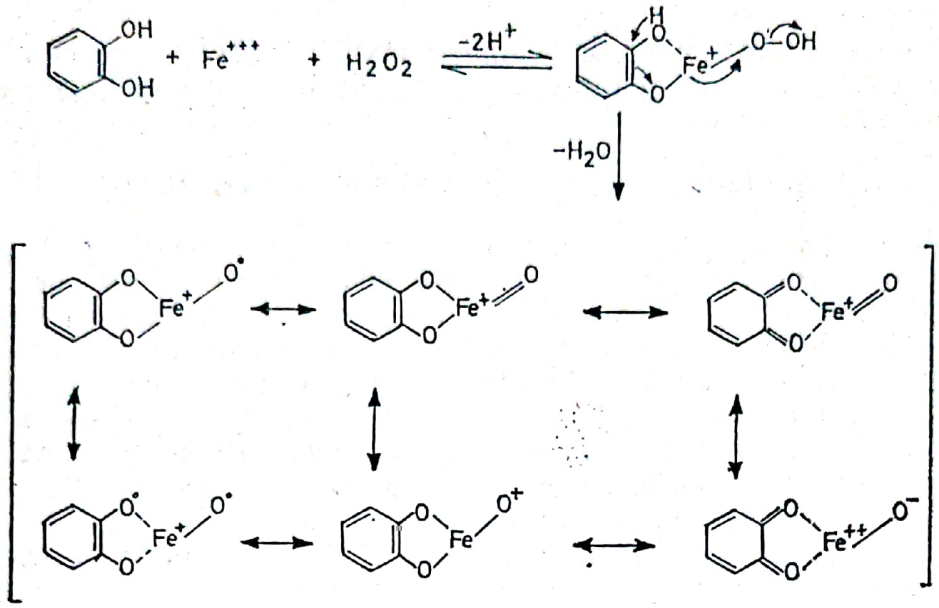


Fig. 8.1. Reacția de oxidare a 1,2-dihidroxibenzen în cetonele de către sistemul Fe^{3+} — H_2O_2. După Hamilton [44]

(Capitolul 7.5.1). Dealtfel hidroxilarea unor compuși cu nucleu aromatic poate fi realizată experimental fie prin reacția (7), ori (5) [37, 94]. Reacția de hidroxilare produsă de Fe^{3+} și H_2O_2 seamănă ca mecanism cu acțiunea peroxidazică a catalazei sau peroxidazelor. În fig. 8.1. este prezentat acest mecanism în cazul catecolului sau a 1,2- ori 1,4-dihidroxibenzenului.

8.1.2. OXIDOREDUCTAZE

Reducerea O_2 pe cale enzimatică are loc atît bivalent cît și univalent, cu ajutorul unor enzime care în majoritate conțin unul sau mai mulți ioni metalici complexați prin rezidiile aminoacidice din apoproteină. H_2O_2 apare mai ales în reducerea bivalentă a O_2 conform ecuației (9):

$$DH_2 + O_2 \longrightarrow D + H_2O_2 \qquad (9)$$

Reducerea univalentă a O_2 produce în special O_2^{-}, ce determină în unele cazuri toxicitatea O_2 datorită formării radicalilor $^1O_2$ sau $OH^{\cdot}$ [43] cu reactivitate mare (Capitolul 10). După cum s-a arătat în Capitolul 1.3, reducerea univalentă, deși nocivă organismului prin producerea de radicali, este totuși răspîndită datorită sistemelor protectoare ce înlătură excesul de forme activate ale O_2.

Printre substraturile oxidoreductazelor, H_2O_2 ocupă un loc destul de modest, deoarece după cum afirma Haliwell [42] acest peroxid ori nu

Scanned with OKEN Scanner

este luat în considerare, ori metodele de detecţie nu sînt destul de sensibile. Un caz ilustrativ este cel al oxigenazelor (oxigen transferaze) ce catalizează reacţia (10) înrudită cu cea precedentă (9):

$$DH_2 + O_2 \longrightarrow D(OH)_2 \qquad (10)$$

Dintre oxigenazele cunoscute, lipoxigenaza produce peroxizi lipidici (Capitolul 7.4.) şi numai triptofan oxigenaza (E.C.1.13.1.12) poate produce H_2O_2 conform reacţiei:

$$\text{L-Triptofan} + O_2 \longrightarrow \text{L-formilkinurenină} + H_2O_2 \qquad (11)$$

Lucrările mai vechi [8, 56] omit producerea H_2O_2 socotindu-l probabil ca rezultat al unor impurităţi. Această enzimă este indusă de substrat şi glucocorticoizi într-o formă inactivă. Activarea se produce prin legarea reversibilă a unei grupări hem cuplată cu oxidarea unui reducător ca ascorbat sau glutation redus [70]. După cum au arătat Brady şi colaboratorii [13], în cursul activării se produc O_2^- şi H_2O_2 ca urmare a oxidării reducătorului catalizînd legarea grupării hem. Prezenţa catalazei ce descompune H_2O_2 va inhiba activitatea triptofan oxigenazei.

Nu este exclus ca şi alte oxigenaze, cum ar fi cele ce au ca substrat catecoli sau homogentiziat şi care conţin Fe^{2+}, să necesite de asemenea asocierea cu o reacţie generatoare de H_2O_2.

O a doua grupă de enzime ce produc H_2O_2 aparţin flavinelor sau metalflavinelor. Formarea intermediară a unor forme activate ale oxigenului în cursul oxidării flavinelor a fost prezentată în fig. 7.1. În cursul catalizei la care iau parte flavinele se produc curent radicali semichinoizi detectaţi spectrofotometric sau prin rezonanţă electronică de spin. Dintre flavin enzimele la care s-a admis formarea H_2O_2 ca produs secundar amintim: glucozo-oxidaza (E.C.1.1.3.4.), glicolat oxidaza (E.C.1.1.3.1.), D şi L-amino-acid oxidazele (E.C.1.4.3.2.), sarcozin oxidaza (E.C.1.5.3.1.), monoamin oxidaza (E.C.1.4.3.4.) etc., care catalizează reacţii de forma (9) sau (12):

$$DH + H_2O + O_2 \longrightarrow D' + H_2O_2 \qquad (12)$$

Dintre metalflavinenzime amintim aldehid oxidaza (E.C.1.2.3.1.), xantin oxidaza (E.C.1.2.3.2.), dihidro-orotat dehidrogenaza (E.C.1.3.3.1.). Cazul cel mai interesant este al xantin oxidazei ce conţine în moleculă Fe, Mo şi FAD, acţionează asupra unei game largi de substanţe ca purine, pteridine, aldehide şi poate avea activitate dehidrogenazică faţă de alţi acceptori decît O_2 cum sînt citocrom *c*, coloranţi, chinone etc. [24]. Reacţia de transformare a hipoxantinei în acid uric este însoţită de o producere a unor forme active a O_2 cum sînt O_2^- şi $^1O_2$ [35, 90], care favorizează apariţi a H_2O_2. Sistemul xantin oxidază este des folosit pentru generarea formelor activate ale oxigenului.

A treia grupă de oxidoreductaze aparţine cuproproteinelor ce utilizează numai O_2 ca acceptor indicînd o structură specifică de mare afinitate pentru O_2. Aceste enzime reduc O_2 direct în H_2O, ocupînd în acest sens locuri terminale în lanţurile transportoare de electroni, aşa cum este cazul citocrom oxidazei. Totuşi majoritatea cuproenzimelor acţionează conform reacţiei (9) producînd H_2O_2 aşa cum este cazul galactozo-oxidazei

Scanned with OKEN Scanner

(E.C.1.1.3.9.), diamin oxidazei (E.C.1.4.3.6.), spermin oxidazei (E.C.1.5.3.3.), urat oxidazei (E.C.1.7.3.3.) și ascorbat oxidazei (E.C.1.10.3.3.). În cursul

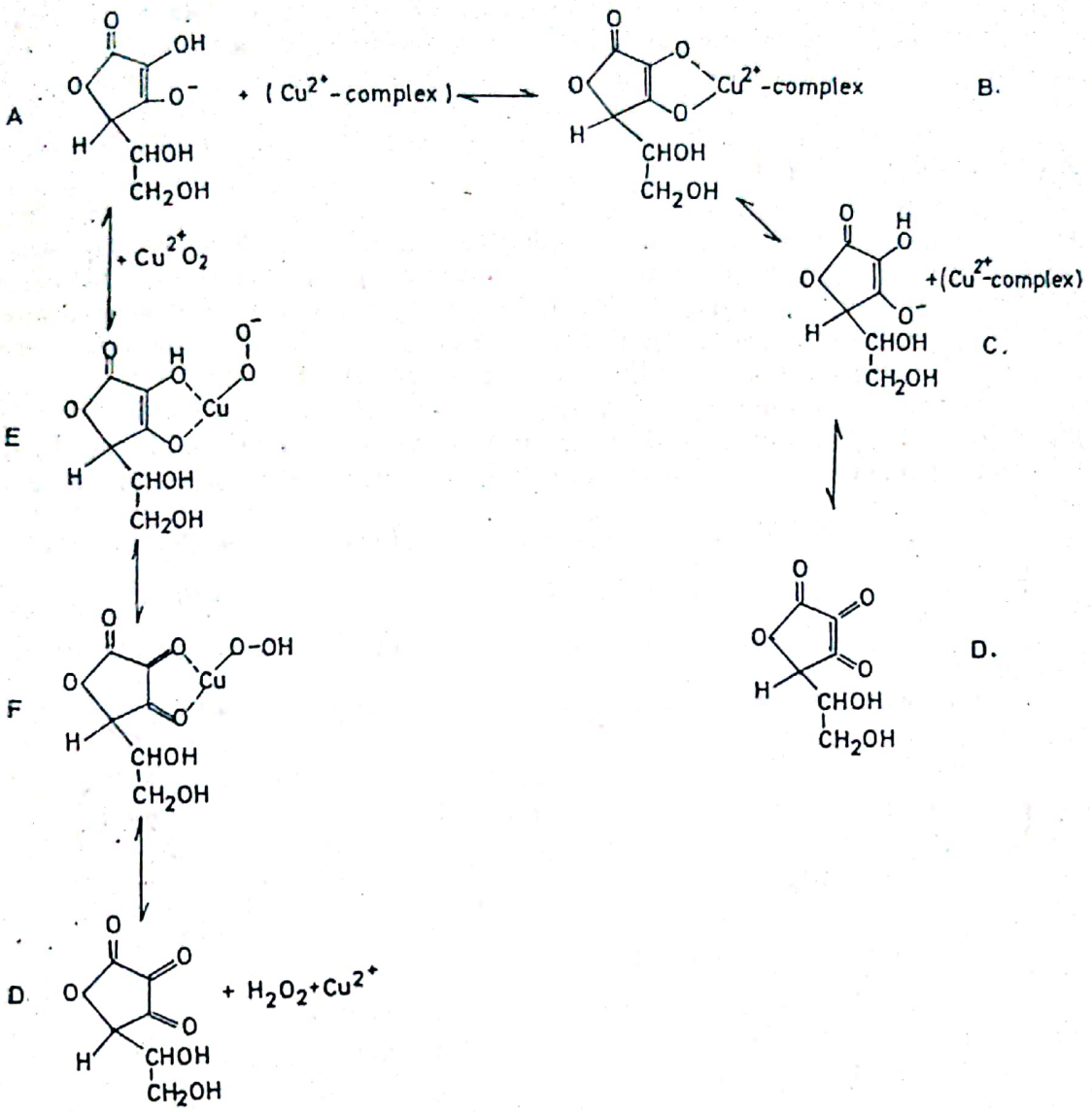


Fig. 8.2. Oxidarea neenzimatică (A, B, C) și enzimatică (A, E, F, D) a acidului ascorbic (A) în acid dehidroascorbic (D). În mecanismul neenzimatic, reacția de disociere a intermediarului B determină viteza întregului proces, pe cînd în cel enzimatic reacția determinantă este cea a transferului de electroni din E în F.

reacției catalitice, Cu^{2+} este redus la Cu monovalent și apoi reoxidat datorită intervenției O_2 sau a H_2O_2. Reacția cea mai interesantă este cea catalizată de ascorbat oxidază (fig. 8.2.).

Mecanismul prezentat în fig. 8.2. presupune formarea intermediară a unui complex între ascorbat, Cu^{2+} și O_2 care în urma unei restructurări se scindează în acid dehidroascorbic, enzimă și H_2O_2. Acidul ascorbic poate fi oxidat de O_2 lent, iar viteza de reacție crește mult în prezența ionilor de Cu^{2+} sau Cu^{2+} complexat. În acest caz reacția decurge după alt mecanism (fig. 8.2) fără producere de H_2O_2, asemănător celor catalizate de

Scanned with OKEN Scanner

Fe^{3+} complexat. Mecanismele propuse nu explică însă efectul inhibitor al H_2O_2 în concentraţie mai mare asupra enzimei şi nici rolul protector al ascorbatului asupra generării $O_2^{\cdot-}$. [41]. Ceruloplasmina, o proteină serică ce conţine 8 atomi de Cu în moleculă, este un inhibitor puternic al peroxidării lipidelor [88] acţionînd asupra sistemului prooxidant format din ascorbat şi Fe^{3+}-linoleat sau omogenat de creier.

8.1.3. PEROXIZOMI

De Duve [27] a descoperit în citoplasma celulelor de ficat un tip special de corpusculi numiţi peroxizomi caracterizaţi prin asocierea mai multor oxidaze ce produc H_2O_2 şi a catalazei, enzimă specializată în descompunerea acestui peroxid. Ulterior, peroxizomi au fost identificaţi în rinichi, intestin, inimă, protozoare, drojdie, bacterii şi plante [27, 28].

Oxidazele ce produc H_2O_2 variază cu ţesutul şi specia, în mod constant găsindu-se D şi L-aminoacid oxidaze şi L-α-hidroxiacid oxidaza. În fig. 8.3. este prezentată o schemă metabolică a enzimelor şi reacţiilor ce se

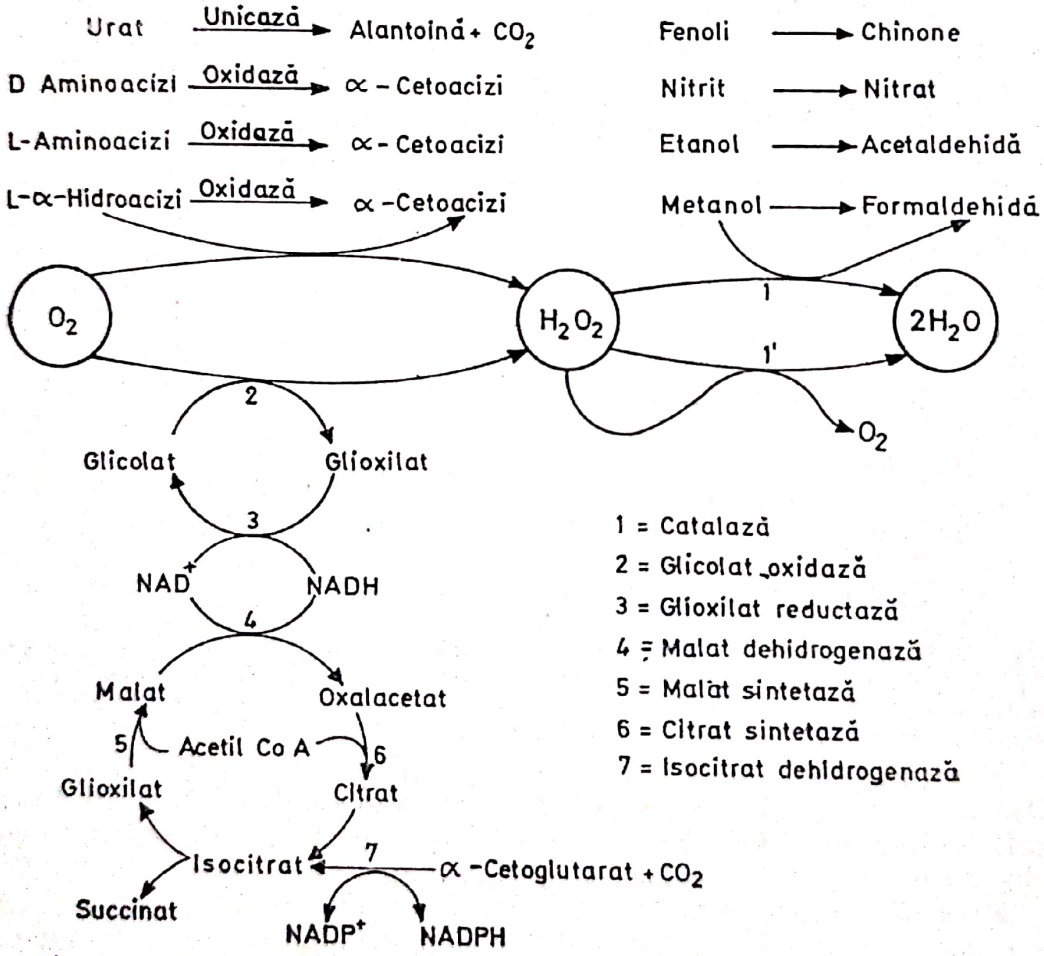


Fig. 8.3. Schema metabolică a enzimelor şi reacţiilor ce au loc în peroxizomi. În partea stîngă sus sînt prezentate o parte din enzimele localizate în peroxizomi, iar în dreapta sus sînt reacţiile peroxidazice ale catalazei. În partea stîngă, în continuare, sînt reacţiile de legătură cu ciclul Krebs din mitocondrii. După De Duve [28].

Scanned with OKEN Scanner

presupun a avea loc în peroxizomi. Se observă conexiunea reacţiilor de producere a H_2O_2 cu activitatea peroxidazică a catalazei şi cu ciclul Krebs. Cum acesta din urmă este localizat în mitocondrii s-a presupus o legătură funcţională între cele două feluri de organite, cu atît mai mult cu cît în ficat pare să existe un raport de 1 peroxizom pentru fiecare 4 mitocondrii. Pe de altă parte, Novikoff [69] crede că peroxizomii provin din reticulul endoplasmic neted, deci din microzomi. Tot de peroxizomi aparţin şi glioxizomii izolaţi în plante, ce conţin aceleaşi enzime, dar sînt mai bogate în glioxilază şi par să participe în fotorespiraţie. După Gerhardt [38] tranziţia glioxizomi în peroxizomi se face în depozitele de lipide din cotiledoanele plantelor în perioada de germinaţie.

Din fig. 8.3. se observă că peroxizomii participă în procesul respiraţiei dar nelegat de o eliberare de energie. Se pare că 20% din respiraţia totală tisulară se datoreşte peroxizomilor [47]. În timp ce respiraţia mitocondrială este independentă de presiunea O_2, cea din peroxizomi este direct proporţională cu pO_2, proprietate ce permite organismului să facă faţă unei hiperoxii. La plante, expunerea la lumină produce creşterea respiraţiei prin peroxizomi.

La plante, protozoare şi drojdie, peroxizomii sintetizează succinat ce va fi metabolizat prin mitocondrii, proces nedemonstrat la organisme mari. Oricum peroxizomii par să constituie o legătură între gluconeogeneză şi lipide. Recent Lazarow [58] a găsit în peroxizomi din ficat acil-CoA dehidrogenază, crotonază şi β-hidroxiacil-CoA dehidrogenază şi tiolază, enzime responsabile de β-oxidarea acizilor graşi cu catenă lungă, proces ce se credea că are loc doar în mitocondrii. În prezenţa unui exces de coenzimă A, peroxizomii purificaţi oxidează palmitoil-CoA în acetil-CoA şi NADH, concomitent cu reducerea O_2 la H_2O_2. În plus tot Lazarow a identificat în peroxizomi şi carnitină o formă de acetat activ, cît şi carnitin acetiltransferază de asemenea implicate în oxidare. Or, această enzimă a mai fost identificată în peroxizomii animalelor ce fuseseră tratate cu un medicament hipolipidemiant, clofibrat [51]. Administrarea acestui medicament constituie un procedeu pentru mărirea numărului de peroxizomi din ficat. După Lazarow [57, 58] peroxizomii constituie un control al trecerii metabolice a glucidelor în lipide, explicîndu-se astfel prezenţa peroxizomilor în ţesutul adipos şi variaţia acestor corpusculi în funcţie de activitatea fiziologică a acestui ţesut [2]. Injectarea catalazei, component principal al peroxizomilor, în sînge, produce o scădere a colesterolemiei şi a fost încercată ca tratament al aterosclerozei cu un succes moderat [48]. De asemenea la o suşe de şobolani s-a observat o relaţie inversă între peroxizomi şi trigliceride serice.

8.1.4. MITOCONDRII

În organismele superioare, reducerea O_2 la H_2O şi cu conservarea simultană a energiei chimice sub formă de ATP este localizată mai ales în mitocondrii. Această reducere se produce în urma labilizării hidrogenului de-a lungul unui lanţ transportor de electroni şi multă vreme s-a crezut că reducerea este exclusiv tetravalentă. Localizarea în mitocondrii a superoxid dismutazei şi a glutation peroxidazei specializate în descompunerea O_2^- şi respectiv

H_2O_2 a promovat studii ce au arătat că aceste specii reactive se produc într-adevăr în mitocondrii în urma unei reduceri bivalente a O_2 asociată cu procesul principal de reducere tetravalente. Amploarea formării H_2O_2 este indicată în tabelul 8.1.

Tabelul 8.1.

Vitezele reacţiilor de formare a H_2O_2 în fracţiuni subcelulare

Fracţiunea subcelulară	Viteza formării H_2O_2 nmoli/mg proteină/min.	Condiţii	Referinţă
Peroxizomi (ficat şobolan)	0,9	Substrat endogen	[16, 34]
Peroxizomi (ficat şobolan)	8,6—16,4	Suplimentat cu acid uric	[10]
Microzomi	1,7	Suplimentat cu NADH	[10]
Mitocondrii	0,7—0,8	Succinat, stare 4	[11]
Mitocondrii	0,5	Succinat, stare 4	[62]
Anacystes nidulans (alge)	400	Succinat, iluminare	[73]
Cloroplaste (spanac)	nedeterminat	Feredoxină sau iluminare	[87]

Din tabelul 8.1 se observă că producerea H_2O_2 în mitocondrii *in vitro*, chiar în condiţii speciale, este de mică intensitate comparativ cu peroxizomi ori cu microzomi. Determinări pe particule submitocondriale (obţinute prin distrugere ultrasonică) şi care nu mai conţin cele două enzime menţionate au arătat totuşi o producere de H_2O_2 dar numai în condiţii speciale : succinat ca substrat şi un inhibitor ca antimicina [63]. Viteza formării H_2O_2 se dublează după adăugarea superoxid dismutazei ceea ce indică evident apariţia peroxidului ca urmare a reacţiei de dismutare (1). Ţinînd seama de dismutarea $O_2^{\cdot-}$ spontană ce decurge cu o constantă de viteză de $10^6\ M^{-1}\ s^{-1}$ s-a apreciat formarea H_2O_2 în particule submitocondriale ca de aproximativ 0,3 nmoli/mg proteină/minut [63]. Date suplimentare au întărit convingerea că H_2O_2 observat în mitocondrii provine din reacţia de dismutare a $O_2^{\cdot-}$ [34, 68].

Lanţul transportor de electroni din mitocondrii este prezentat în fig. 8.4. împreună cu inhibitori specifici ce acţionează asupra anumitor porţiuni bine stabilite. În timp ce toţi inhibitorii ce blochează transportul

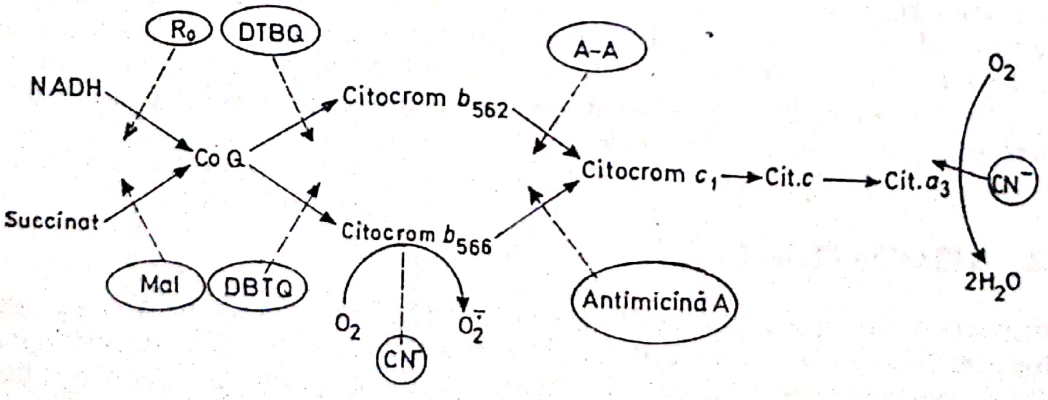


Fig. 8.4. Reprezentarea schematică a lanţului respirator mitocondrial şi locurile de acţiune ale unor inhibitori specifici : R_0 = rotenonă, Mal = malonat, DBTQ = dibromotimochinonă, AA = antimicină, CN = cianuri. După Flohe [34]

Scanned with OKEN Scanner

de electroni în porțiunea citocromilor *b* inhibă formarea H_2O_2, antimicina, ce acționează tot asupra citocromilor *b* dar în partea O_2, determină creșterea formării H_2O_2 atît în particule submitocondriale, cît și în mitocondrii intacte necuplate. Formarea mitocondrială a H_2O_2 este de asemenea inhibată de extragerea ubichinonei din sistem. Cercetările grupului germano-italian [34, 63] au arătat că formarea mitocondrială a H_2O_2 se datorește afinității mari a citocromului b_{566} pentru O_2. Creșterea afinității citocromului se produce prin reducerea lui în prezența ATP, odată cu tranziția din starea 3 în 4 [15]. Nohl și Hegner [68] au arătat recent că mitocondrii incubate în prezența ATP generează O_2^- cînd toți componenții lanțului transportor de partea citocromului c_1 sînt în stare redusă. Formarea O_2^- crește cu vîrsta animalelor ajungînd pentru mitocondrii de inimă de la șobolani bătrîni la 2,54 nmol/mg/minut față de 1,9 nmoli la cei tineri. Din această cantitate relativ mare de radicali O_2^-, o cantitate constantă de 80% este transformată în H_2O_2 de către superoxid dismutază. Restul de O_2^- difuzează prin membranele mitocondriale trecînd în citoplasmă unde poate iniția peroxidarea acizilor grași nesaturați. Într-adevăr, concomitent cu detectarea formării O_2^- și a H_2O_2 în mitocondrii s-au putut măsura atît peroxizi lipidici, cît și produsele lor de degradare [68, 97]. Adăugarea superoxid dismutazei în mediul de incubare produce o inhibare a peroxidării cu 50%. Fiziologic, prezența superoxid dismutazei și glutation peroxidazei în mitocondrii protejează contra excesului de O_2^- și respectiv H_2O_2, dar în condiții patologice enzimele protectoare pot fi afectate și atunci peroxidarea lipidelor poate avea loc.

In vitro, formarea peroxizilor lipidici în mitocondrii a fost observată de mult, în urma studiilor privind ciclul umflare-contractare [59, 67]. Lehninger [59] a descoperit că adăugarea de ATP sau glutation redus la o suspensie de mitocondrii produce modificări ale membranelor mitocondriale drept consecință a umflării lor, efect observabil prin variația absorbției. Formarea peroxizilor lipidici se produce numai în cazul umflării produse de glutation sau ascorbat, dar nu și în cea inițiată de ATP, fosfat sau tiroxină, sugerînd existența a două mecanisme diferite. Contractarea se datorește eliberării din membranele mitocondriale, în urma umflării, a unor factori de contractare identificați ca glutation peroxidază și catalază [29], enzime specializate în descompunerea H_2O_2. Ulterior, Painter și Hunter [71] au arătat că peroxidarea lipidelor din mitocondrii este asociată reducerii citocromului *c* de către amestecul de glutation redus și oxidat, reacții cuplate cu reformarea ATP din ADP și fosfat anorganic. Variațiile citocromului *c* și a ATP pot modifica peroxidarea lipidelor mitocondriale și procesul de umflare-contractare.

Incubarea unor suspensii de mitocondrii intacte sau fragmentate în condiții speciale produce formarea O_2^-, H_2O_2, peroxizilor lipidici și a produșilor finali de descompunere (fig. 8.5 A, B, C). Necesitatea adăugării superoxid dismutazei purificate sugerează rolul dismutării O_2^- în generarea H_2O_2. În fig. 8.5. C se observă absorbția lipidelor extrase din mitocondrii supuse acțiunii unui sistem generator de O_2^-; cuplarea oxidării adrenalinei în adrenocrom de către O_2^- generat de sistemul xantină-xantin oxidază permite măsurarea formării superoxidului prin determinarea fluorometrică a produsului oxidării scopoletinei de către H_2O_2 format (B) și absorbția lipidelor după formarea O_2^- și H_2O_2(C). În fig. 8.5 C se observă maxi-

mul de la 235 nm datorit conjugării dien și cel mai mic de la 280 nm produs de aldehide și cetonele rezultate în urma descompunerii hidroperoxizilor.

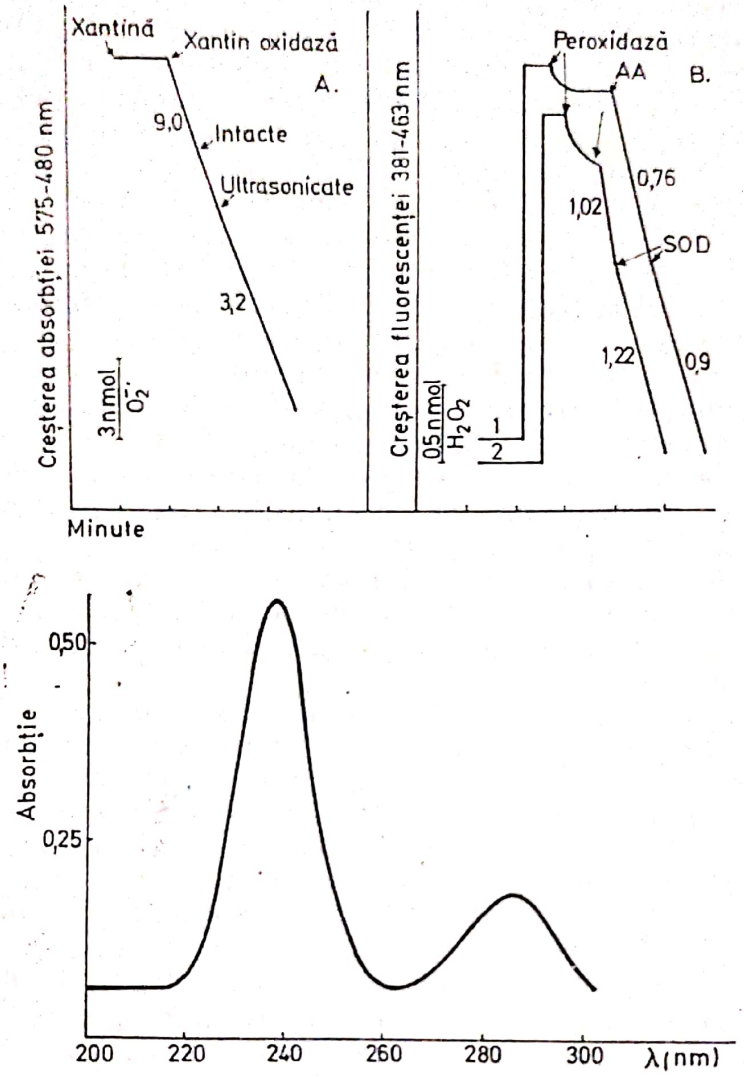


Fig. 8.5. Formarea $O_2^{\cdot-}$(A), a H_2O_2 (B) și a peroxizilor lipidici (C) în mitocondrii. A. Formarea $O_2^{\cdot-}$ în mitocondrii de inimă de șobolan, intacte și ultrasonicate în urma generării de $O_2^{\cdot-}$ prin sistemul xantină (1 mM)+xantin oxidază (0,01 μM) și măsurată prin cuplarea cu oxidarea adrenalinei (1 mM). B. Formarea H_2O_2 în mitocondrii ; 1. mitocondrii 1 mg/ml + succinat 5 mM, se adaugă apoi peroxidază 0,5 μg, Antimicina A 0,5 μg și superoxid dismutază 2 μM ; 2. aceeași componenți + scopoletină 2 μM. C. Absorbția datorită dublelor legături conjugate (235 nm) în lipidele mitocondriale (0,5 mg) și a cetonelor + aldehidelor derivate (280 nm). Numerele din grafice indică nmoli $O_2^{\cdot-}$ și respectiv H_2O_2 format/minut/mg proteină. După Nohl și Hegner [68]

La animalele bătrîne, în mitocondriile de ficat incubate în astfel de condiții s-au găsit cantități crescute de peroxizi și mai ales a produșilor lor

Scanned with OKEN Scanner

de degradare [53, 68]. Prezența superoxid dismutazei în membranele interne mitocondriale indică posibilitatea reducerii O_2 univalente și a formării peroxizilor *in vivo*.

8.2. FAGOCITOZA

Leucocitele fagocitare sînt compuse din două feluri de celule : polimorfonucleare (PMN), cu nucleu multilobat și de o viață foarte scurtă, și fagocitele mononucleare (FMN) cu nucleu mare și de viață lungă. Rolul acestor celule este a găsi, distruge și îndepărta materiale străine organismului (bacterii, particule etc.). Cu excepția macrofagelor tisulare, leucocitele fagocitare se deplasează spre locul infecției ca răspuns la mediatorii chimici eliberați de bacterii (chemotaxis). După sosire la centrul infecției, fagocitele recunosc ținta printr-un mecanism încă necunoscut în care este implicată natura membranei bacteriei, dar și o serie de factori imuni umorali ce produc opsonizarea membranei bacteriene sau a particulei ce trebuie distrusă. Leucocitele fagocitare apoi aderă la suprafața bacteriei, emit pseudopode ce înconjură agentul nociv printr-o membrană de origine plasmatică numită fagosom.

Aceste etape ale fagocitozei se cunoșteau de mult, dar cercetările din ultimii 6—8 ani au arătat că distrugerea agentului patogen de către fagocite implică un proces foarte complex biochimic, la care participă mai multe sisteme enzimatice și că distrugerea bacteriei se datorește formelor activate ale O_2, fiind eliberați atît radicalii $^1O_2$, $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$, cît și H_2O_2 [6, 19]. Pentru eliberarea acestor specii reactive este desigur necesară cuplarea fagocitozei cu glicoliza ca sursă de energie.

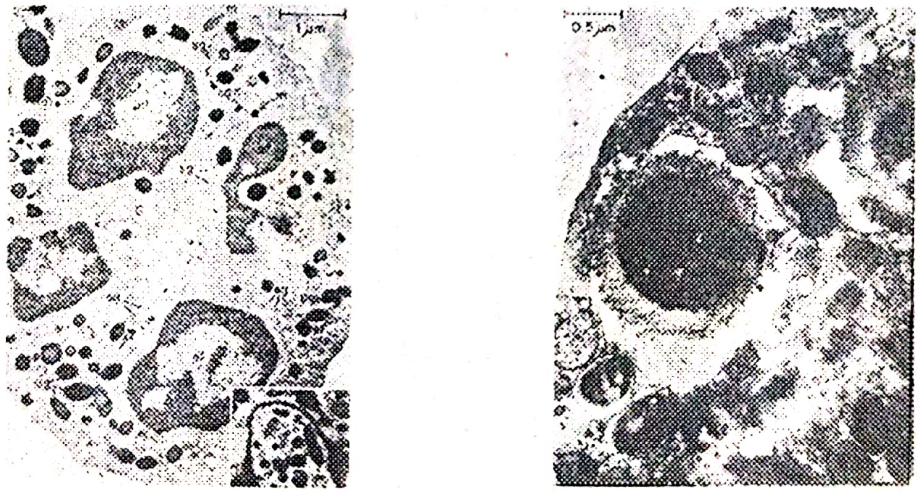


Fig. 8.6. Degranularea neutrofilelor fagocitare. Stînga : Neutrofil din sînge de om ; sg = granule specifice ; og = granule azurofile, n^1— n^4 = lobi nucleari, G = aparat Golgi, er = reticul endoplasmic, m = mitocondrii. Dreapta : Degranularea într-o veziculă conținînd o particulă de drojdie (Z), vezicul fagocitic (V), granul (G). Săgețile indică granule în proces de fuziune cu vezicule fagocitare. După Babior [6].

De îndată ce agentul patogen a fost înconjurat de fagosomii leucocitului se declanșează a doua etapă în care se produce o degranulare a lizozomilor din citoplasma leucocitelor (fig. 8.6.) după o prealabilă migrare a lor spre fagosomi. Lizozomii eliberează o serie de enzime printre care

Scanned with OKEN Scanner

și cele hidrolitice necesare digestiei micro-organismului. Concomitent *p*H-ul intracelular scade considerabil, astfel ca enzimele hidrolitice să acționeze la valori optime de *p*H. Urmează apoi cel mai spectaculos episod al fagocitozei, în care se produce o creștere remarcabilă a respirației intracelulare (*respiratory burst*) datorită unui consum mare de O_2 necesar activării lui și formării radicalilor amintiți mai sus. Datorită prezenței superoxid dismutazei, se produce o formare de H_2O_2 prin reacția de dismutare (1.8), necesar sistemului antimicrobian mieloperoxidază-H_2O_2-halogenură. Acțiunea combinată a radicalilor liberi, sistemelor antimicrobiene, enzimelor hidrolitice produce halogenarea, proteoliza și decarboxilarea pereților bacterieni. Ca o consecință a acestor procese mai apar produși secundari ca peroxizi lipidici, produșii lor de descompunere, aminoaldehide, de asemenea toxici unor specii bacteriene [85]. În acțiunea de distrugere mai participă, încă neclar, unele proteine ca lactoferina, lisozim, fosfolipaze ș.a.. Desigur, digestia micro-organismelor nu este perfectă, datorită diversității lor este probabil nevoie de o gamă largă de sisteme de distrugere ale leucocitelor. Toate leucocitele implicate în fagocitoză circulă cîtva timp cu incluziuni ale micro-organismelor incomplet digerate, mai ales provenite din bacterii gram-negative.

Schematic, principalele etape ale fagocitozei sînt prezentate în fig. 8.7 A, în special aderarea (1) micro-organismului, înconjurarea lui cu fagosomi (2) și începutul digestiei (3). De asemenea au fost trecute principalele reacții de formare a radicalilor liberi ai oxigenului, cît și faptul că aceștia difuzează în afara celulei, determinînd o chemiluminiscență ce a devenit o metodă de apreciere cantitativă a fagocitozei [49, 96].

În fig. 8.7. B și C sînt trecute principalele reacții ce produc radicalii liberi ai oxigenului, interconversiunile (B) și sistemele cuplate de reacții ce duc la producerea H_2O_2 (C).

Toate felurile de leucocite au un consum de O_2 variind foarte mult; de la foarte mic în cazul neutrofilului, la apreciabil pentru macrofage [83]. Toate leucocitele macrofage însă prezintă o creștere marcată a consumului de O_2, insensibilă la acțiunea inhibitorilor respirației mitocondriale. Creșterea respirației cuprinde intensificarea a patru reacții „*four increases*" și anume: a consumului de O_2, producerii $O_2^{\cdot-}$ și H_2O_2, și a activității șuntului pentozofosfat, o ramură a glicolizei. Deși creșterea respirației fagocitelor stimulate constă din intensificarea celor 4 reacții, toate depind de activitatea unei singure enzime, NADPH oxidaza, care catalizează reducerea univalentă a O_2 la superoxid $O_2^{\cdot-}$, folosind NADPH ca donor de electroni, conform ecuației (13):

$$2\,O_2 + NADPH \longrightarrow 2\,O_2^{\cdot-} + NADP^+ + H^+ \qquad (13)$$

Enzima este localizată în membranele plasmatice și conține FAD drept grupare prostetică [5]. Majoritatea O_2 consumat (80%) trece în H_2O_2 format în urma dismutării superoxidului sub acțiunea superoxid dismutazei (reacția 1), ambele reacții fiind prezentate și în fig. 8.7. A și B.

În fig. 8.7. B mai sînt prezentate reacții ce produc alți radicali liberi singlet $^1O_2$ și hidroxil $OH^{\cdot}$, care apar ca urmare a reacției Haber-Weiss

Scanned with OKEN Scanner

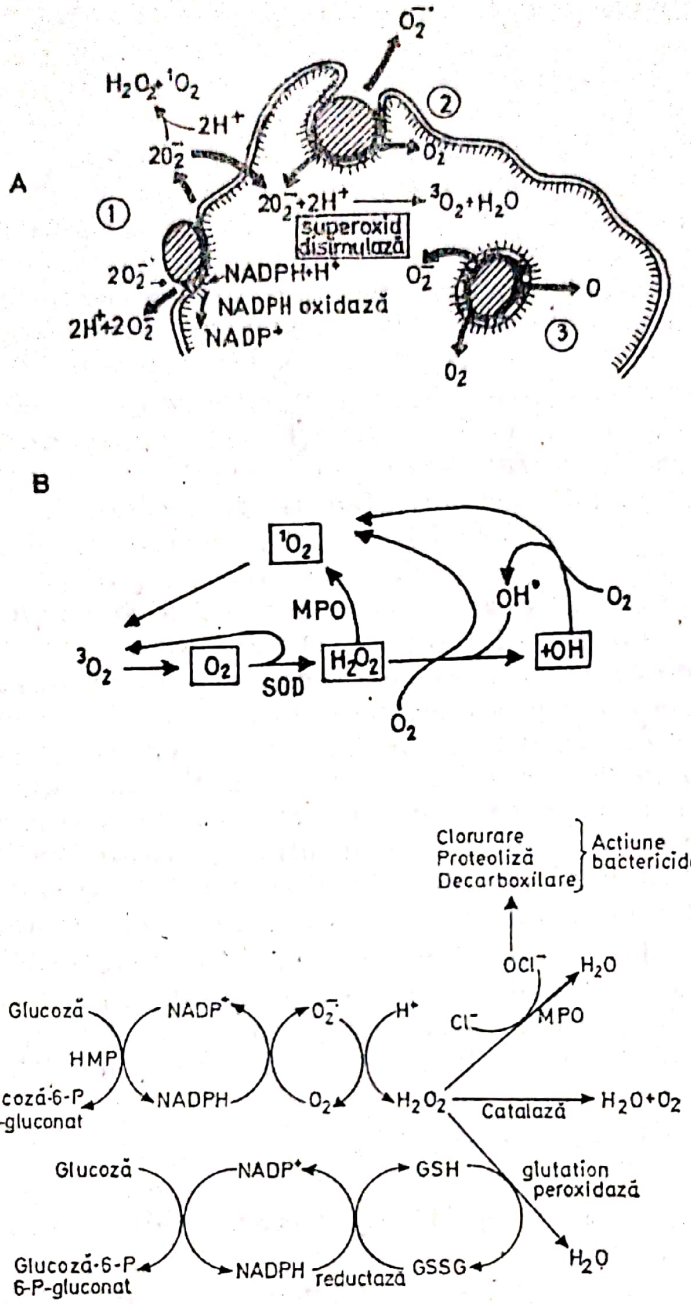


Fig. 8.7. Procesele biochimice din fagocitoză. A. Aderarea micro-organismelor la fagocite (1), activarea NADPH oxidazei, invaginarea prin pseudopode ; $O_2^{\cdot-}$ este generat și în afara celulei și formează H_2O_2 și $^1O_2$ (2). Formarea fagosomului, generarea de $O_2^{\cdot-}$ și difuzia lui în citoplasmă (3).
B. Interacțiile dintre formele activate ale oxigenului ; SOD = superoxid dismutază, MPO = mieloperoxidază.
C. Formarea și degradarea H_2O_2. Peroxidul de hidrogen este format din acțiunea superoxid dismutazei sau prin șuntul pentozofosfat (HMP) și folosit pentru reacția catalizată de MPO. Excesul de H_2O_2 este descompus prin acțiunea catalazei și a glutation peroxidazei. După Babior [6].

Scanned with OKEN Scanner

descrisă anterior (Capitolul 1.4.), şi reamintită în (8). $^1O_2$ mai apare şi în urma descompunerii H_2O_2 catalizată de mieloperoxidază

$$OCl^- + H_2O_2 \rightarrow {}^1O_2 + Cl^- + H_2O \qquad (14)$$

Dovezi suplimentare în favoarea apariţiei $^1O_2$ au fost aduse prin acţiunea inhibitoare a captatorilor specifici singletului, 1,4-diazobiciclo (2,2,2) octan şi a carotenoizilor [7]. Radicalul hidroxil OH· provine tot din reacţia Haber-Weiss, fig. 8.7. B, prezenţa lui fiind sugerată de acţiunea inhibitoare a captatorilor specifici, benzoat de sodiu şi manitol [23, 65]. Prezenţa radicalilor amintiţi a mai fost demonstrată recent prin studii ale rezonanţei electronice de spin [35] sau chemiluminiscenţă [92, 98].

Revenind la cele 4 reacţii, componente a creşterii bruşte a respiraţiei fagocitelor stimulate, trebuie menţionată intensificarea activităţii şuntului pentozofosfat sau hexozomonofosfat, ca ramură a glicolizei şi schiţată în fig. 8.7. C. Scopul intensificării activităţii şuntului pentozofosfat este furnizarea NADPH necesar activităţii NADPH oxidazei. Sursele de $NADP^+$ sînt în primul rînd reacţia (13) de producere a O_2^-, iar a doua este cea catalizată de glutation reductază (fig. 8.7. C). După cum se observă din această figură, H_2O_2 este toxic fagocitului, din moment ce acesta este dotat cu trei sisteme enzimatice ce catalizează descompunerea excesului de peroxid : glutation peroxidază, catalază şi mieloperoxidază. Prezenţa glutation peroxidazei în fagocite a explicat implicarea NADPH şi nu a NADH în reacţia oxidazică de bază (13). În timp ce nivelele NAD şi NADH nu variază la neutrofile înainte şi în timpul fagocitozei, NADP şi NADPH cresc şi respectiv scad prin stimulare [82]. De asemenea, valoarea constantei K_m este de 3,7 mM pentru NADH şi de 0,5 mM pentru NADPH, ce indică o mai mare afinitate a enzimei pentru NADPH [80].

Rolul ionilor de mangan este foarte controversat. După Curnutte [25] şi Patriarca [72], Mn^{++} ar avea un rol de amplificator neenzimatic al peroxidării, participînd drept catalizator la un lanţ peroxidant cu dezvoltare de radicali liberi, datorită cuplării reacţiilor (15) :

$$\begin{aligned}
&O_2 + H^+ + e^- \longrightarrow HO_2\cdot \\
&HO_2\cdot + Mn^{++} + H^+ \longrightarrow H_2O_2 + Mn^{+++} \qquad (15) \\
&Mn^{+++} + NADPH \longrightarrow Mn^{++} + NADP^+ + H^+ \\
&NADP^+ + O_2^- + H^+ \longrightarrow NADP^+ + HO_2\cdot
\end{aligned}$$

Ulterior [5], rolul Mn^{++} a fost contestat, observîndu-se că proprietăţile NADPH oxidazei din neutrofile pot fi mimate de orice sursă artificială de O_2^-. NADPH oxidaza prezintă o activitate de cinci ori mai mare în fagocite aflate în cursul fagocitozei [19, 79]. În schimb în leucocitele pacienţilor cu granulomatoză cronică, fagocitoza nu poate avea loc din cauza deficitului genetic în NADPH oxidază [19,40]. De asemenea pacienţii cu deficit genetic în glucozo-6-fosfat dehidrogenază, enzimă determinantă

Scanned with OKEN Scanner

în șuntul pentozofosfat, creșterea bruscă a respirației este mult micșorată datorită insuficienței în $NADP^+$ [6]. Testarea capacității leucocitelor fagocitare de a produce o creștere bruscă a respirației în urma stimulării *in vitro* (prin bacterii sau drojdie opsonizate) a devenit un examen clinic al unui eventual deficit în fagocitoză. Un prim test este al reducerii colorantului nitro blue tetrazoliu (NBT). Acesta este un acceptor de electroni, galben, hidrosolubil, care în urma reducerii de către O_2^- trece în formazan albastru, insolubil [81].

Al doilea test al capacității de fagocitare este bazat tot pe producerea superoxidului, ce determină, probabil în asociere cu ceilalți radicali ai O_2^-, o chemiluminiscență. Deși acest fenomen a fost confirmat de mai mulți cercetători [4, 18, 65], intensitatea lui este foarte mică, fiind necesară pentru măsurare contoare de scintilație sensibile. Chemiluminiscența nu apare la leucocitele în stare de repaus și este inhibată de catalază sau superoxid dismutază. Orice substanță care se găsește în mediul de reacție și care se oxidează eliberînd $^1O_2$ sau H_2O_2 produce de asemenea o chemiluminiscență ce interferă cu cea dată de fagocitoză. De aceea emisia de lumină ce însoțește fagocitoza este un fenomen nespecific creșterii respirației, dar poate fi folosit ca test cu condiția calibrării în prealabil a condițiilor de stimulare [92, 95, 98].

Neutrofilele sînt bogate în acid ascorbic [31] și s-a încercat stabilirea unui rol al acestui compus. În sisteme artificiale s-a găsit că un număr mare de bacterii sînt ucise de un amestec format din ascorbat, H_2O_2 și Cu^{++} [26]. Miller [66] a mai arătat că sistemul H_2O_2—Cu^{++}—ascorbat deși este slab bactericid față de *Salmonella pullorum*, potențează foarte mult distrugerea acestui micro-organism de către lizozim. Inhibarea efectului de potențare a acestui sistem de către tiosulfat, un captator de radicali liberi sugerează implicarea acestora în susceptibilitatea agentului patogen la acțiunea lizozimului.

8.3. H_2O_2 ȘI MIELOPEROXIDAZA

Participarea mieloperoxidazei în acțiunea bactericidă a neutrofilelor a fost demonstrată de Klebanoff [54] și confirmată de alți cercetători. Acest sistem antibacterian este eficient față de un număr mare de bacterii, fungi, micoplasmă și virusuri și se compune din mieloperoxidază, H_2O_2 (sau un sistem generator de H_2O_2) și o halogenură ca Cl^-, Br^-, I^- sau SCN^-. Ținînd seama de concentrațiile fiziologice, în fagocite va acționa Cl^- (90 mM), iar în tiroidă acest rol va fi jucat de ioduri. Concentrațiile fiziologice depășesc cu mult necesitățile stoichiometrice ce sînt de ordinul μM (60). Valorile *p*H-ului optim variază între 5—6, fiind de același ordin de mărime cu cel din granulațiile fagocitelor.

Mecanismele ce stau în baza acestui sistem au fost în parte elucidate de Klebanoff și colaboratorii [55, 78], care au arătat că H_2O_2 poate fi generat de sistemul xantină-xantin oxidază conform fig. 8.8. și a reacțiilor cuplate (16), (1) și (14), catalizate de xantin oxidază, superoxid

$$\text{Xantină} + O_2 \xrightarrow{\text{xantin oxidază}} \text{Acid uric} + O_2^-. \qquad (16)$$

Scanned with OKEN Scanner

dismutază și mieloperoxidază. Acest sistem *in vitro* are un marcat efect bactericid față de unele micro-organisme ca *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* și *Candida tropicalis*. Mecanismul propus de Klebanoff în fig. 8.8 a fost verificat prin acțiunea unor inhibitori specifici ce acționează în

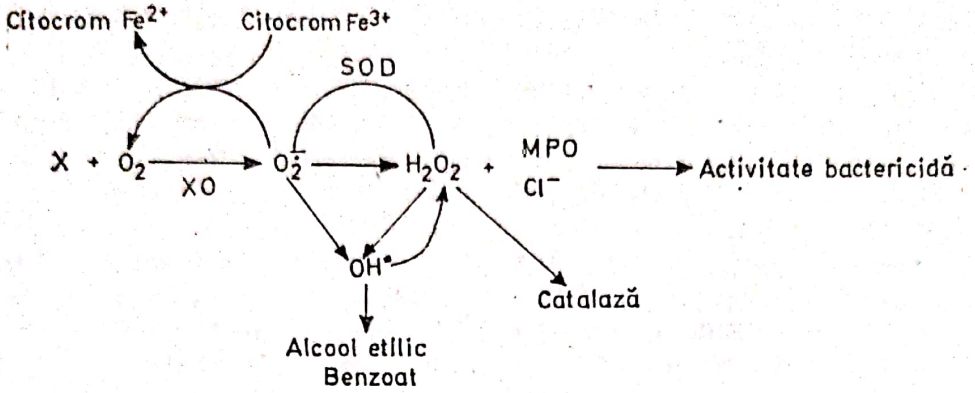


Fig. 8.8. Sistemul bactericid xantină (X) — xantin oxidază (XO)-cloruri (Cl^-)-mieloperoxidază (MPO) și legăturile cu reducerea citocromului c și cu producerea de radicali OH·. După Klebanoff [55].

anumite poziții. Astfel, cuplarea reacției xantin oxidazice (16) cu reducerea citocromului *c* oxidat va sustrage o parte din O_2^- necesar producerii H_2O_2; același efect va fi produs și de un exces (5 μg) de superoxid dismutază, acționînd probabil nespecific. Captatorii radicalului hidroxil OH· cum sînt benzoatul și etanolul inhibă reacția asociată (8). Inhibitorii $^1O_2$ cum sînt difenilfuran, bilirubină, histidină acționează la nivelul reacției catalizată de mieloperoxidază (14). Catalaza inhibă de asemenea prin descompunerea H_2O_2 rezultată în reacția (1), de dismutare. În fine, inhibitorii clasici ai hemoproteinelor, azida și cianurile inactivează sistemul bactericid la nivelul mieloperoxidazei [77].

O dovadă suplimentară a producerii de radicali liberi ai O_2 de către sistemul descris o constituie emiterea de chemiluminiscență în cursul reacțiilor prezentate în fig. 8.8. Studii recente [14, 93] au arătat că lumina emisă de fagocite în timpul fagocitozei, cu maxim la 570 nm se datorește reacțiilor cuplate la sistemul H_2O_2—Cl^--mieloperoxidază și în special producerii $^1O_2$ în reacția (14), deoarece inhibitorii singletului cum sînt difenilfuran, bilirubină, histidină, β-caroten inhibă atît activitatea sistemului bactericid, cît și chemiluminiscența observată atît la sistemul izolat, cît și în fagocite.

Sistemul bactericid prezentat a trezit un interes deosebit în ultimul timp care completează astfel cunoștințele încă insuficiente despre rolul acestuia în organism. Astfel sistemul a fost observat în salivă și lacrimi [50] explicîndu-se astfel unele credințe populare în capacitatea bactericidă a acestor secreții. Deficitul ereditar în mieloperoxidază [22] sau asociat cu anemii feriprive micșorează rezistența la infecții [22, 50]. Sistemul bactericid a mai fost observat și în trombocite, în cursul reacției de eliberare se poate pune în evidență și mieloperoxidaza.

Experimente cu I^- radioactiv au arătat [76] că distrugerea bacteriilor în cursul fagocitozei este însoțită de o încorporare a iodului în proteinele bacteriene fagocitate datorită mieloperoxidazei. Reacția de iodurare este inhibată de azidă și cianuri, specifici peroxidazelor. Introducerea I^- în membrana bacteriei probabil că produce o labilizare ușurînd astfel accesul speciilor reactive produse în cursul fagocitozei. În acest sens probabil că și Cl^- are un rol asemănător.

O altă reacție asociată cu mieloperoxidaza și sistemul în care acționează este cea de decarboxilare oxidativă a amino acizilor, conform reacției (17). Se presupune formarea intermediară a unei cloramine

$$R-CHNH_2-COOH+Cl^-+H_2O_2 \longrightarrow R-CH(Cl)NH-COOH \longrightarrow$$

$$\longrightarrow R-CHO + CO_2 + NH_3 \qquad (17)$$

și producerea în final de aldehide cu un atom de carbon mai puțin decît amino acidul inițial [84, 86]. Reacția are loc de asemenea în cursul fagocitozei și este inhibată de cianuri și azidă. În plus reacția (17) este inhibată și de taurină printr-un mecanism de competiție pentru sistem:

$$CH_2NH-CH_2SO_3^- + H_2O_2 + Cl^- \longrightarrow CH_2NHCl - CH_2SO_3^- \qquad (18)$$

Încă nu se știe rolul acestor aldehide și al acestei reacții asociată cu fagocitoza. După toate experimentele întreprinse [84, 86] această reacție contribuie la labilizarea membranelor bacteriene ușurînd pătrunderea agenților implicați direct în uciderea microorganismelor. Aldehidele formate nu sînt suficient de toxice pentru a fi implicate direct în uciderea microorganismelor, iar inhibarea reacției (17) nu micșorează eficiența fagocitozei de către neutrofile [21]. Sistemul mieloperoxidază-H_2O_2-halogenură dezvoltă radicali liberi cu energie suficient de mare care să producă efecte citotoxice asupra unor varietăți mari de celule cum sînt eritrocite, spermatozoizi și mai ales celule tumorale [20]. Leucocite mononucleare (monocite și limfocite) sînt de asemenea sensibile. Importanța acestei proprietăți a sistemului mieloperoxidazic pentru procesul inflamator sau cancerogeneză a fost luată în considerare [17].

Sistemul mieloperoxidază-H_2O_2-iodură este de asemenea prezent în glanda tiroidă, dar cu hormoni tiroidieni iodurați (triiodotironină și tiroxină) în locul iodurii [9]. În acest caz, sistemul ar contribui la catabolismul hormonilor tiroidieni. O dovadă suplimentară a rolului acestui sistem în tiroidă este intensificarea paralelă a activității șuntului pentozofosfat furnizor de NADPH necesar sistemului de detoxifiere al H_2O_2 bazat pe glutation reductază și peroxidază (fig. 8.7) [57, 63].

Cercetările asupra sistemului mieloperoxidază-H_2O_2-halogenură aparțin mai mult lui Klebanoff și colaboratorilor [54, 55, 78], care au lucrat cel mai adesea pe fagocite. Recent Aune și Thomas [4] au descoperit un sistem antimicrobian foarte înrudit în salivă și lapte format din lactoperoxidază-H_2O_2-tiocianat (SCN^-). Deoarece SCN^- are o acțiune antitiroidiană s-a presupus o participare a tiroxinei asupra oxidării tiocianatului. Ulterior [89] s-a arătat că sistemul catalizat de lactoperoxidază

Scanned with OKEN Scanner

cuprinde mai multe reacţii ce încep cu oxidarea tiocia nurilor de către H_2O_2 în prezenţa lactoperoxidazei şi a unor grupări SH proteice conform reacţiilor (19) :

$$SCN^- + H_2O_2 \xrightarrow{\text{lacto peroxidază}} OSCN^- + H_2O \qquad (19)$$

$$OSCN^- + \text{protein}-SH \longrightarrow \text{protein}-S-SCN + OH^-$$

$$\text{Protein}-S-SCN + RSH \longrightarrow \text{Protein}-S-S-\text{Protein} + SCN^- + H^+$$

Compusul R—SH poate fi cisteină sau glutation redus. În cazul albuminei, oxidarea grupărilor sale SH este proporţională cu concentraţia H_2O_2 şi independentă de cea a SCN^-. Abilitatea anionilor de a înlocui SCN^- descreşte în ordinea $SCN^- > I^- > SO_3^{2-} > Br^- > Cl^-$.

Sistemele antibacteriene bazate pe peroxidaze—H_2O_2—halogenură au fost detectate în multe celule şi rezultatele activităţii lor sînt în special radicali liberi ai oxigenului [74, 96], dar şi alţi produşi printre care chiar şi cianuri [96]. Aceşti produşi posedă proprietăţi citotoxice, atît graţie energiei radicalilor (chemiluminiscenţă), cît şi toxice (CN^- sau $OSCN^-$) suficient de mari ca să fie eficienţi atît faţă de microorganisme, cît şi chiar faţă de celula care i-a generat.

8.4. FOTOSINTEZA

În secţiunea 7.1. s-a arătat că viaţa aerobă pe pămînt a apărut mai tîrziu ca urmare a activităţii microorganismelor fotosintetizante şi că adoptarea O_2 ca element esenţial a presupus găsirea unor sisteme de apărare faţă de formele active ale oxigenului. Deşi fotosinteza se cunoaşte destul de bine, totuşi nu se poate răspunde precis dacă în cursul acestui complicat proces apar şi radicali ai O_2 sau peroxizi.

Se ştie că fotosinteza cuprinde reacţii fotochimice şi sintetice, şi că produşii finali sînt O_2 şi carbon redus organic. În urma reacţiilor fotochimice, H_2O este descompusă în elementele componente, O_2 este eliminat în atmosferă, iar H este reţinut într-o formă utilă de reducător (NADPH). Energia eliberată este conservată sub formă de ATP, iar prin reacţii sintetice *„la întuneric"* CO_2 este încorporat şi redus [75, 61]. Fotosinteza reprezintă un transfer fotopotenţiat de electroni faţă de un gradient de energie de la un donor (H_2O) la acceptori (piridin nucleotizi), cu participarea unor transportori (citocromi, plastocianine, fer neheminic, flavoproteine). Lumina intră prin două *„antene de clorofilă"* în cîte un fotosistem, denumite I şi II (fig. 8.9.).

Fotosistemul I cuprinde reacţiile de transfer prin intermediul piridin nucleotidelor, are un centru de reacţie cu clorofilă (P_{700}), generînd un reducător puternic (ubichinonă-feredoxină). Fotosistemul II cuprinde reacţiile de *„oxidare a apei"*, are un centru de reacţie cu clorofilă (P_{680}) generînd un oxidant puternic (chinonă). Cele două sisteme formează un lanţ legat cu aproximativ 400 molecule de clorofilă şi caroteni ce colectează cuante

Scanned with OKEN Scanner

de lumină între 400—700 nm transferîndu-le spre centrii de reacție. O moleculă de clorofilă primește 10 fotoni/secundă și 400 molecule dintr-o unitate captează aproximativ 2 000 cuante/secundă.

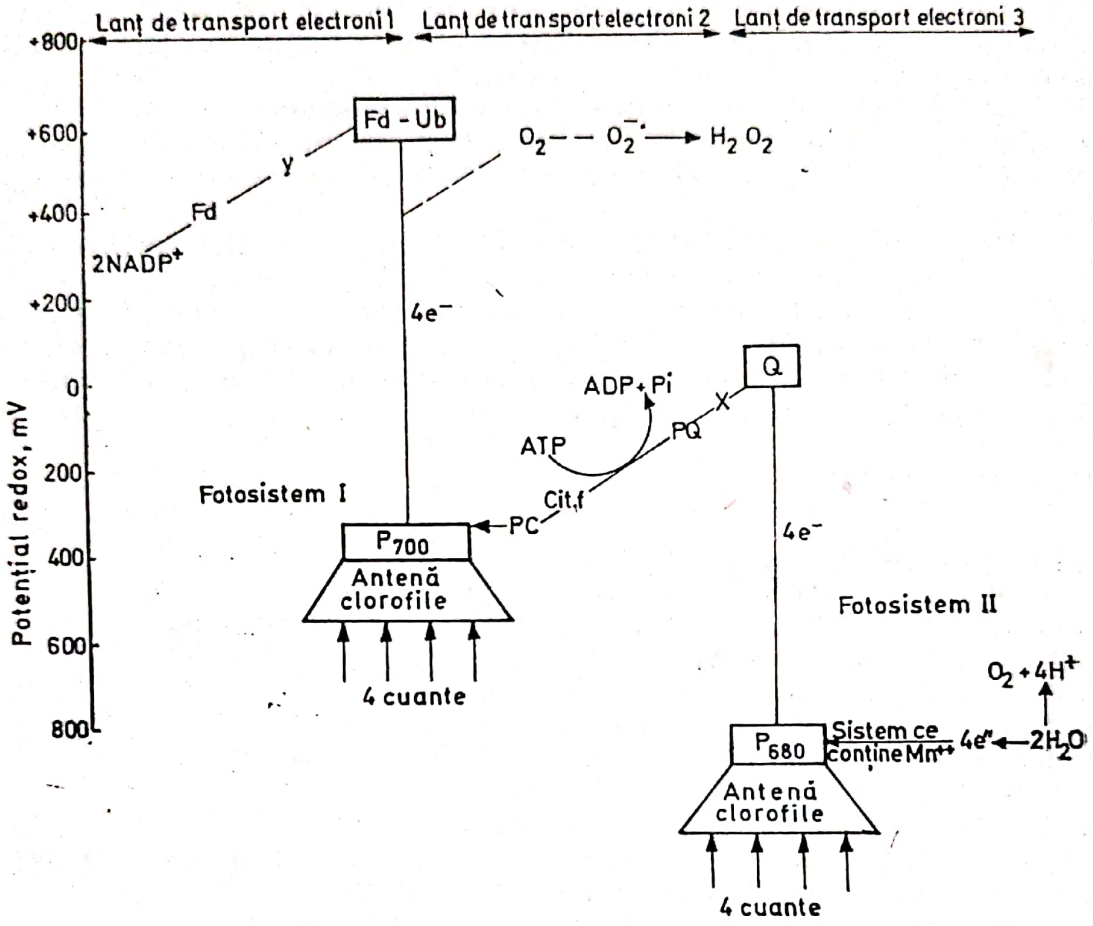


Fig. 8.9. Reprezentarea schematică a lanțurilor transportoare de electroni din cloroplast.

Formarea O_2 din H_2O este o reacție esențială pentru fotosinteză și are loc în fotosistemul II prin 5 trepte diferite de oxidare S_0—S_4. În mod normal nu ar trebui să apară forme activate ale O_2. Totuși date recente [12, 61, 94] au indicat prezența $O_2^{-\cdot}$, sau a $OH^{\cdot}$ în urma distrugerii catabolice a clorofilei [45], ba chiar a peroxizilor lipidici în cloroplaste rezultați în urma acțiunii lipoxigenazei [30]. Totuși în cloroplaste au fost detectate superoxid dismutază, catalază și peroxidaze, enzime cu rol de detoxifiere față de $O_2^{-\cdot}$, H_2O_2. Prezența superoxid dismutazei la plante poate fi interpretată ca avînd o origine simbiotică, prin marcarea trecerii la fotosinteza oxigenantă [49]. Conform reacției (8.1.) catalizată de superoxid dismutază se produce H_2O_2, localizată probabil la capătul fotosistemului I sau II (fig. 8.9.). Într-adevăr cercetări recente au demonstrat prezența H_2O_2 în ambele fotosisteme prin folosirea inhibitorilor specifici ai transportului de electroni: dibromotimochinonă sau 2,3-dimetil-5,6 metilenedioxi-*p*-benzochinonă [32] sau flash-fotoliză [91]. Acumularea H_2O_2 duce la inhibarea fotosintezei, mai ales cînd și catalaza este blocată

prin azidă sau cianuri. Acest ultim efect observat de Forti și Gerolo [36] leagă acumularea peroxidului de inhibarea reducerii fosfogliceratului, reacție dependentă de ATP și NADPH. Prin această lucrare se explică unul din cele mai interesante exemple de toxicitate a O_2.

Astfel, în timpul fotosintezei, CO_2 este fixat prin ciclul de reacții cunoscut drept ciclul lui Calvin. Ribulozo difosfat carboxilaza este enzima care fixează CO_2 conform reacției (20):

$$\text{Ribulozo-1,5-difosfat} + CO_2 \longrightarrow \text{2,3-fosfoglicerat} \qquad (20)$$

O_2 inhibă această carboxilare deoarece poate deveni substrat reacției (21) intrînd în competiție pentru ribulozo-1,5-difosfat. Valoarea constantei K_m pentru O_2,

$$\text{Ribulozo-1,5-difosfat} + O_2 \longrightarrow \text{3-fosfoglicerat} + \text{2-fosfoglicolat} \qquad (21)$$

deși este mult mai mare decît cea pentru CO_2 va permite reacției (21) să aibă loc la tensiuni înalte de O_2 inhibînd reacția normală (20) și cu aceasta și creșterea plantei. Producerea reacției (21) reprezintă o deviere de la calea metabolică normală și poate avea loc și prin acumularea unor concentrații mari de H_2O_2.

BIBLIOGRAFIE

1. H. AEBI, *Rad. Res., Suppl.*, **3**, 146 (1965).
2. I. AHLAHO, T. BARNARD, *J. Histochem. Cytochem.*, **19**, 670 (1971).
3. P. A. ALFOLDY, B. M. LUMMEL, *Cell Med. Immunol.*, **12**, 263 (1979).
4. T. M. AUNE, E. L. THOMAS, *Biochemistry*, **17**, 1005 (1978).
5. B. M. BABIOR, R. S. KIPNES, *Blood*, **50**, 517 (1977).
6. B. M. BABIOR, *New Engl, J. Med.*, **298**, 659, 721 (1978).
7. R. L. BAEHNER, L. A. BOXER, J. M. ALLEN, *Blood*, **50**, 327 (1977).
8. A. BOVERIS, B. CHANCE, *Biochem. J.*, **134**, 707 (1973).
9. A. BOVERIS, R. A. SANCHEZ, *FEBS Lett.*, **92**, 333 (1978).
10. F. O. BRADY, H. J. FORMAN, P. FIEGELSON, *J. Biol. Chem.*, **246**, 7119 (1971).
11. A. BOVERIS, B. CHANCE, *Biochem. J.* **134**, 707 (1973).
12. A. BOVERIS, R. A. SANCHEZ, *FEBS Lett.*, **92**, 333 (1978).
13. F. O. BRADY, H. J. FORMAN, P. FEIGELSON, *J. Biol., Chem.*, **246**, 7119 (1971).
14. P. A. CEH, A. PAPATHANASIOU, *Blood*, **53**, 403 (1979).
15. B. CHANCE, G. WILLIAMS, *Advances in Enzymology*, **17**, 65 (1956).
16. B. CHANCE, N. OSHINO, *Biochem. J.*, **122**, 225 (1971).
17. T. CHANDRA, R. DOS, *Eur. J. Biochem.*, **72**, 259 (1977).
18. B. D. CHESON, R. L. CHRISTENSEN, R. SPERLING, *J. Clin. Invest.*, **58**, 789 (1976).
19. B. D. CHESON, J. T. CURNUTTE, B. M. BABIOR în „Progress în Clinical Immunology" edit. R.Q. Schwartz, Grune Straton, New York, vol. 3, cap. 1, 1977.
20. R. A. CLARK, S. J. KLEBANOFF, *Blood*, **45**, 161 (1975).
21. R. A. CLARK, S. J. KLEBANOFF, *Blood*, **50**, 65 (1977).
22. R. A. CLARK, S. J. KLEBANOFF, *J. Clin. Invest.*, **63**, 177 (1979).
23. A. CLIFARELLI, F. PARADISI, *Res. Exp. Med.*, **174**, 197 (1979).
24. A. CRISTEA, E. TOMAS, R. OLINESCU, „Procese bioenergetice și oxidoreducerea enzimatică", Editura științifică, Cap. 5—7, București, 1973.
25. J. T. CURNUTTE, M. L. KARNOVSKY, B. M. BABIOR, *J. Clin. Invest.*, **57**, 1059 (1976).
26. L. R. DE CHATELET, M. R. COOPER, *Antimicrob. Agents Chemotherap.*, **1**, 12 (1972).

Scanned with OKEN Scanner

27. C. DE DUVE, P. BAUDHUIN, *Physiol., Rev.*, **46**, 323 (1966).
28. C. DE DUVE, *Proc. Roy. Soc. B*, **173**, 71 (1969).
29. O. DIONISI, T. GALEOTTI, *Biochim. Biophys. Acta*, **403**, 292 (1975).
30. R. DOUILLARD, E. BERGERON, *C.R. Acad. Sci. Ser. D*, **286**, 753 (1978).
31. D. B. DRATH, M. L. KARNOVSKY, *Infect. Immunol.*, **10**, 1077 (1974).
32. E. F. ELSTNER, D. FROMMAYER, *FEBS Lett.*, **86**, 143 (1978).
33. J. A. FEE, J. S. VALENTINE in „Superoxide and Superoxide Dismutases", edit. A.M. Michelson, I. Fridovich, Academic Press, New York, 19, 1977.
34. L. FLOHE, G. LOSCHEN, A. AZZI, CH. RICHTER in (33) p. 323.
35. K. L. FONG, P.B. MC CAY, J. L. FOYER, *Chem. Biol. Interact.*, **15**, 77 (1976).
36. G. FORTI, P. GEROLO, *Plant. Physiol.*, **55**, 859 (1977).
37. C. FORRANDINI, J. FOOS, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 697 (1978).
38. B. GERHARDT, T. BETSCHE, *Deutsch. Bot., Ges.*, **89**, 321 (1976).
39. M. R. GREEN, H. O. HILL, A. W. SEGAL, *FEBS Lett.*, **100**, 23 (1979).
40. D. C. HAHN, R. I. LEHRER, *J. Clin. Invest.*, **55**, 707 (1975).
41. B. HALLIWELL, *Biochem. J.*, **155**, 697 (1976).
42. B. HALLIWELL, *FEBS Lett.*, **56**, 34 (1975).
43. B. HALLIWELL, *FEBS Lett.*, **92**, 321 (1978).
44. G. C. HAMILTON, *Advances in Enzymology*, **32**, 55 (1969).
45. J. R. HARBOUR, J. R. BOLTON, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 231 (1978).
46. G. E. HATCH, D. E. GRADNER, D. B. MENZEL, *J. Exp. Med.*, **147**, 182 (1978).
47. A. G. HILDEBRANDT, I. ROOTS, *Methods in Enzymology*, **52**, 342 (1978).
48. V. HERZOG, H. D. FAHIMI, *Science*, **185**, 271 (1974).
49. J. INMUNDSEN, D. O. HALL, *Nature*, **257**, 670 (1975).
50. P. JETGREN, C. ALTAY, *Acta Hematol.*, **61**, 10 (1979).
51. C. L. JONES, A. K. HAJRA, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **76**, 1138 (1977).
52. K. KAMDA, T. ONO, *Biochim. Biophys. Acta*, **572**, 77 (1979).
53. R. M. KASCHNITZ, Y. HATEFI, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **171**, 292 (1975).
54. S. J. KLEBANOFF, W. H. CLEM, *Biochim. Biophys. Acta*, **117**, 63 (1966).
55. S. J. KLEBANOFF, *J. Biol. Chem.*, **249**, 3724 (1974).
56. W. E. KNOX, M. M. PIRAS, K. TOKUYAMA, *J. Biol. Chem.*, **241**, 297 (1966).
57. P. LAZAROW, *Science*, **197**, 580 (1977).
58. P. LAZAROW, *J. Biol. Chem.*, **253**, 1522 (1978).
59. A. L. LEHNINGER, *J. Biol. Chem.*, **237**, 946 (1962).
60. R. I. LEHRER, *J. Bacteriol.*, **99**, 361 (1969).
61. S. LIEN, A SAN PIETRO, *FEBS Lett.*, **99**, 189 (1979).
62. G. LOSCHEN, A. AZZI, L. FLOHE, *Hoppe Seyler's Z. Phys. Chem.*, **354**, 791 (1973).
63. G. LOSCHEN, A. AZZI, C. RICHTER, *FEBS Lett.*, **48**, 62 (1974).
64. J. MC CORD, E. D. DRY, *FEBS Lett.*, **86**, 139 (1978).
65. P. R. MILES, V. CASTRANOVA, *Am. J. Physiol.*, **235**, C103 (1978).
66. T. E. MILLER, *J. Bacteriol.*, **98**, 949 (1969).
67. D. NEUBERT, A. B. WAYTCZAK, A. LEHNINGER, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **42**, 1651 (1963).
68. H. NOHL, D. HEGNER, *Eur. J. Biochem.*, **82**, 563 (1978).
69. P. M. NOVIKOFF, A. B. NOVIKOFF, *J. Cell Biol.*, **53**, 532 (1972).
70. R. OLINESCU, E. PASCU, *Rev. Roum. Biochim.*, **11**, 185 (1974).
71. A. A. PAINTER, F. E. HUNTER, *J. Biol. Chem.*, **239**, 614 (1964).
72. P. PATRIARCA, P. DRI, F. ROSSI, *Biochem. Biophys. Acta*, **385**, 380 (1975).
73. O. P. PATTERSON, J. MYERS, *Plant Physiol.*, **51**, 104 (1973).
74. J. PIATT, P. J. O'BREEN, *Eur. J. Biochem.*, **93**. 323 (1979).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 9

SISTEME DE PROTECȚIE CONTRA PEROXIZILOR ÎN ORGANISME

După cum s-a arătat în capitolele precedente, interacțiunea oxigenului cu viața organizată prezintă numeroase și variate aspecte, în care formele activate ale O_2 și peroxizii ce rezultă sînt uneori necesari pentru labilizarea, scindarea, degradarea oxidativă a unor compuși de interes biologic. Dar reacțiile în care se produc formele activate ale O_2, cît și peroxizii sînt mult mai numeroase decît sînt necesari acești radicali sau compuși intermediari. Pe de altă parte, așa cum se va arăta în Capitolul 10, peroxizii sau formele activate ale O_2 pot produce multe daune organismelor mergînd de la inactivarea unor substanțe utile pînă la distrugerea sau moartea celulară.

Datorită prezenței în organisme a unor substraturi, favorabile peroxidării cum sînt acizii grași polinesaturați, cît și a unor agenți prooxidanți ca ionii metalici (Fe, Co) (Capitolul 7.4), evoluția vieții aerobe superior organizate a depins de elaborarea unor sisteme de protecție eficiente contra toxicității oxigenului manifestată prin producerea de forme activate ale O_2 și prin peroxizi. În Capitolul 7.1 s-a arătat că trecerea vieții spre forme aerobe a fost condiționată de producerea superoxid dismutazei, enzimă ce catalizează dismutarea $O_2^{-\cdot}$. Așa cum se arată în fig. 9.1, orga-

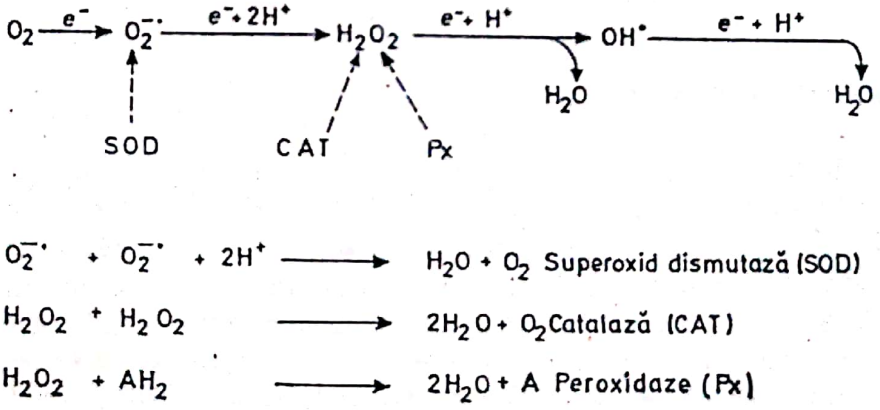


Fig. 9.1. Calea univalentă de reducere a oxigenului și sistemele enzimatice de protecție contra intermediarilor formați.

nismele aerobe și-au alcătuit o serie de sisteme de protecție contra toxicității O_2 situate la diferite nivele. Din fig. 9.1 se observă în primul rînd că aproape toți compușii implicați în toxicitatea O_2 constituie substratul unei enzime ce catalizează astfel neutralizarea lor. În al doilea rînd, așa

Scanned with OKEN Scanner

cum toxicitatea O_2 se datorește mai multor reacții cuplate (Capitolele 1.3, 2.2, 7.2), tot așa și sistemele de protecție se pot înlănțui sau suprapune, fiind capabile să utilizeze același substrat (H_2O_2) sau să se înlocuiască în cazul unui deficit enzimatic congenital.

Sisteme de protecție cuprind atît agenți neenzimatici (hemoproteine, acid ascorbic), dar mai ales enzimele menționate în fig. 9.1, ce posedă drept grupare prostetică unul din agenții neenzimatici. Formarea enzimelor protectoare a reprezentat o formă superioară de apărare comparativ cu cele neenzimatice, datorită unei eficiențe optime ca viteză de reacție, specificitate, sensibilitate la concentrații variate de substrat. Datorită formelor variate ale sistemelor de protecție, deficitul congenital sau blocarea unuia din ele va trece neobservat clinic prin compensarea eficientă cu ajutorul celorlalte sisteme. De aceea în fragmente de țesuturi, recoltate post-mortem sau în omogenate tisulare, în care sistemele de protecție enzimatice nu mai acționează, peroxidarea se produce imediat cu o deosebită intensitate. Prezența acestor numeroase sisteme de protecție constituie o dovadă a necesității lor în toate celulele aerobe, iar depășirea capacității lor va determina consecințe dăunătoare.

9.1. SISTEME NEENZIMATICE

Antioxidanții naturali menționați în Capitolul 5 acționează în multe medii biologice. Dar, așa cum s-a arătat, pentru o protecție eficientă chiar în medii nebiologice, se folosesc amestecuri sinergice de antioxidanți pentru a face față multiplicității factorilor prooxidanți și a condițiilor în care are loc peroxidarea. În medii biologice, unde condițiile sînt mult mai variate se impune necesitatea mai multor agenți cu structuri și funcțiuni variate. În plus, unii din ei, cum sînt compușii conținînd gruparea hem și acidul ascorbic au roluri paradoxale, de agenți prooxidanți la concentrații mici și de antioxidanți la cele mari.

9.1.1. HEMOPROTEINE

În Capitolele 3.3 și 7.4.2 s-a amintit că prin complexarea ionilor Fe^{3+} sau Fe^{2+} cu porfirine se obțin prooxidanți mult mai eficienți decît componenții acționînd separat. Prin complexare se produce o gamă mai largă de concentrații solubile asigurînd penetrabilitatea agentului în microstructuri. Lewis și Wills [49] au arătat că unele hemoproteine inhibă peroxidarea *in vitro* a acizilor grași nesaturați, concentratia efectivă a citocromului c și hemoglobinei se situează în jur de 10^{-5} M, adică aproximativ în domeniul fiziologic. Tot Lewis și Wills au mai arătat că omogenatele din ficat, inimă și splină (ce rețin mult sînge) se comportă asemănător hemoproteinelor, exercitînd un efect prooxidant în concentrații mici (0,5%) și inhibitor la cele mari (5%). Efectul inhibitor asupra peroxidării exercitat de hemoglobină și citocromul *c* asigură parțial o protecție eficientă în respirația tisulară, asigurînd transportul O_2 în hematii și mitocondrii [66].

Scanned with OKEN Scanner

9.1.2. ACIDUL ASCORBIC

În capitolul precedent (7.4.3), s-a arătat că ţinînd seama de concentraţiile fiziologice şi de unele date experimentale, acidul ascorbic exercită un rol predominant prooxidant.

Totuşi, ţinînd seama de reacţia acidului ascorbic cu H_2O_2 şi cu $O_2^{\cdot-}$ ce produce acid dehidroascorbic şi de observaţia lui Abramson [1], că în animale scorbutice se găsesc cantităţi subnormale de peroxizi lipidici mai ales în creier, s-a emis [35] ipoteza unui rol protector pentru acidul ascorbic, probabil la concentraţii mai mari (10^{-3} M).

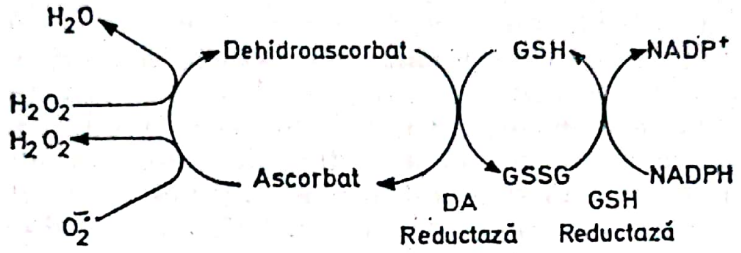


Fig. 9.2. Relaţia acidului ascorbic cu glutationul în cloroplaste. DA = dehidroascorbat, GSH şi GSSG = glutation redus şi oxidat. După Foyer şi Halliwell [28]

Rolul protector al ascorbatului ar putea fi real doar în strînsă legătură cu reacţia de oxidare a glutationului redus (GSH). Un astfel de sistem a fost pus în evidenţă în cloroplaste de către Foyer şi Halliwell [28] şi este prezentat în fig. 9.2. Astfel, reacţia (9.1) catalizată de glutation reductază (E.C.1.6.4.2) se cuplează cu reacţia (9.2) catalizată

$$GSSG + NADPH + H^+ \rightleftharpoons 2\ GSH + NADP^+ \qquad (9.1.)$$

$$\text{Dehidroascorbat} + 2\ GSH \rightleftharpoons GSSG + \text{Ascorbat} \qquad (9.2.)$$

de dehidroascorbat reductază (E.C.1.8.5.1.). Sursa de $O_2^{\cdot-}$ şi de H_2O_2 este asigurată de reacţiile ce se produc prin iluminarea cloroplastelor, aşa cum s-a arătat în Capitolul 8.4. În plante s-au găsit cantităţi relativ mari de GSH şi acid ascorbic. Primul compus este necesar pentru stabilizarea enzimelor ce conţin gruparea sulfhidril (SH).

O altă dovadă pentru un rol protector al acidului ascorbic în concentraţii mari este dată de experimente ce arată [23] că şi în ţesuturi animale ascorbatul interferă cu radicali liberi şi peroxizi. O interesantă aplicaţie a sistemului prezentat în fig. 9.2 a fost identificarea lui în limfocite şi granulocite de către Stankova şi colaboratorii [92]. Ei au găsit că deşi limfocitele şi granulocitele au aceleaşi concentraţii fiziologice în ascorbat şi GSH, radiosensibilitatea foarte mare a limfocitelor se datoreşte cantităţii insuficiente de dehidroascorbat reductază (reacţia 9.2) şi deci incompletei regenerări a acidului ascorbic. În plus Jacob şi Jandl [41] au observat în cazul hematiilor o legătură directă între oxidarea ascorbatului şi regenerarea GSH prin intermediul şuntului pentozofosfat. Prin oxidarea

Scanned with OKEN Scanner

in vitro a acidului ascorbic într-o suspensie de hematii se produce o creştere de 12 ori a ponderii şuntului pentozofosfat ca urmare a oxidării concomitente şi a GSH.

Ţinînd seama de producerea de peroxizi în cazul metabolizării unor medicamente (Capitolul 7.5), apariţia unei toxicităţi ridicate în scorbut în urma administrării unor medicamente [102] aduce o dovadă suplimentară pentru un rol protector al acidului ascorbic contra peroxidării.

9.1.3. VITAMINA E

Vitamina E sau α-tocoferol (tetrametil 6-hidroxicroman; fig. 5.2), deşi este cunoscută de 57 ani, continuă să stîrnească controverse asupra funcţiilor, mecanismelor de reacţie sau chiar necesarului în dietă, fiind denumită chiar „o vitamină în căutarea unei boli" [32, 34]. Vitamina E a fost etichetată ca antioxidant natural şi deficit în acest compus a fost observat în embriogeneză, distrofie musculară, diateză exudativă, encefalomalacie, depunere de lipofuscină în sistemul nervos, turburări ale sistemului hematopoetic, gastrointestinal, reproductiv etc. [17, 32]. Studiile recente, destul de numeroase, deşi au adus multe informaţii, au mărit însă şi mai mult confuzia asupra funcţiilor acestei vitamine şi în special asupra rolului ei ca antioxidant [17, 56, 95].

În favoarea rolului antioxidant a vitaminei E se citează următoarele fapte: a) capacitatea unor antioxidanţi sintetici nelegaţi structural cu tocoferolul de a-l substitui în unele deficienţe b) inhibarea autooxidării lipidelor nesaturate *in vitro* şi *in vivo*, deşi experimentele sînt viu disputate [75], în special datorită conţinutului în acizi graşi din dieta animalelor de experienţă c) deosebita sensibilitate a animalelor cu deficit în vitamina E la O_2 hiperbaric sau ozon [63] şi în acest caz antioxidanţii sintetici înlocuiesc deficitul în tocoferol. Numai la şobolani cu deficit în vitamina E prin expunere la O_2 hiperbaric se produc peroxizi lipidici [21]; d) animalele cu deficit în vitamina E expuse la un stress oxidant (ozon sau O_2 hiperbaric) au o viteză accelerată de formare a pigmentului lipofuscină în sistemul nervos [87] datorită probabil peroxidării acizilor graşi din componenţa membranelor celulare [31].

Alte date experimentale în favoarea rolului de antioxidant al vitaminei E, cum sînt hemoliza hematiilor în prezenţa acidului dialuric [90], perturbarea sintezei vitaminei C [46], prevenirea toxicităţii CCl_4 sau a etanolului [32] observate în condiţii deficitare sînt amplu contestate. În această problemă punctul critic constă în evaluarea corectă a formării peroxizilor lipidici în ţesutul adipos în funcţie de nivelul vitaminei E. Aşa cum a arătat Green [31, 32], numeroasele date experimentale existente nu permit obţinerea unei concluzii clare, mai ales asupra relaţiei dintre acizii graşi polinesaturaţi (AGPN) şi metabolismul vitaminei E. Această relaţie a devenit atît de interesantă încît *Food and Nutrition Board** din Statele Unite au lansat programul *Elgin* destinat studierii efectului calităţii şi cantităţii AGPN din dietă asupra nivelului tocoferolului din sînge, AGPN din ţesuturi şi peroxizi lipidici atît la om cît şi la animale [40].

* Oficiul pentru controlul alimentelor.

Scanned with OKEN Scanner

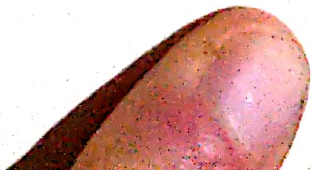
Rezultatele au arătat o mare variaţie în incorporarea AGPN, conţinutul în tocoferol în funcţie de calitatea şi cantitatea grăsimilor din dietă; la om ingerarea zilnică de 60 g ulei de porumb produce incorporarea maximă de AGPN şi de tocoferol (20 mg) spre deosebire de valori minime obţinute cu aceeaşi cantitate de untură sau carne grasă de vacă. Bazat pe aceste date Horwitt [40] propune o nouă formulă a necesarului zilnic în vitamină E legată de cantitatea AGPN ingerată: necesar zilnic în α-tocoferol = =0,25 (%AGPN + g AGPN) + 4 mg.

După Horwitt [40] este necesară o cantitate minimă de 4 mg vitamină E pentru asigurarea unei incorporări normale a AGPN în fosfolipide şi lipoproteine. Această valoare contrazice necesarul de 15 UI α-tocoferol, dar explică de ce în ciuda unei variaţii mari în hrană nivelul vitaminei E în sînge la om variază destul de puţin: 0,5—1,0 mg% [93]. Relaţiile între vitamina E şi metabolismul lipidic nu sînt destul de clare. Rubinstein şi Dietz [82] au observat corelaţii directe între hiperlipemii şi nivelul tocoferolului din ser, mai ales cu concentraţia β-lipoproteinemiei. Pe baza relaţiei dintre vitamina E şi metabolismul lipidic, mai ales a incorporării AGPN în membrane, s-au admis ca deficienţe în vitamina E o serie de stări patologice la om cum ar fi anemii hemolitice la noi născuţi, unele sindroame de malabsorbţie (fibroză cistică a pancreasului), unele forme de tromboflebită (17, 34]. În acest sens citäm lucrarea lui Chiariotti şi Gusti [15] care au observat o scădere cu 50% a nivelului seric al tocoferolului la 24 ore după administrarea Δ^9-tetrahidrocannabinol, un metabolit al marihuanei. Administrarea cronică a acestui metabolit produce la şobolani distrofie musculară şi o alterare persistentă a leucopoiezei din măduvă. *In vitro*, acest metabolit are o acţiune opusă vitaminei E producînd alterarea membranelor celulare.

9.1.4. SELENIUL

Rolul antioxidant al vitaminei E a suferit o reevaluare în urma descoperirii lui Schwarz şi Foltz [85] că Se în cantităţi minime previne eficient multe din simptomele atribuite deficitului în tocoferol. De atunci s-au publicat numeroase lucrări ce atribuie seleniului un rol antioxidant mult mai puternic decît al tocoferolului, cu atît mai mult cu cît unele deficienţe în vitamina E coincid şi cu un nivel scăzut în Se [32]. Ţinînd seama că concentraţia Se în subsol variază mult —de la 0,053 ppm din Noua Zeelandă la 20 ppm (părţi per milion) în Dakota de Sud — rezultă clar că animalele şi în special rozătoarele şi rumegătoarele sînt mult afectate de conţinutul subsolului în Se. Într-adevăr se cunosc la animale o serie de stări patologice ce sînt prevenite prin adăugare în dietă a Se sau a vitaminei E. Aceste stări patologice se datoresc tulburărilor în reproducere (şobolan, porc, cîine), distrofiilor musculare (găini, porc, oi, şobolan), hemolizei (găini, iepuri), acumulării de pigmenţi în ţesutul adipos (găini, oi, vite), necroză hepatică (porc, şobolan) [17].

Un stimulent în cercetarea rolului antioxidant al Se a fost descoperirea lui Rotruck şi colaboratorilor că acest element este un constituent esenţial al glutation peroxidazei, enzimă ce catalizează descompune-



Scanned with OKEN Scanner

rea unei largi game de peroxizi [81]. În continuare s-a demonstrat că activitatea GSH peroxidazei este proporţională cu Se din dietă [94] că deficitul în Se exogen produce o scădere marcată a nivelului GSH peroxidazei din hematii [39] şi că Se^{75} din alimente se încorporează mai ales în GSH peroxidaza din hematii şi ficat [29]. Prin purificări repetate s-a găsit că GSH peroxidaza conţine 4 atomi de Se per moleculă [61].

Un alt aspect al rolului antioxidant al Se a fost descoperirea lui Burk şi Masters [10] că deficitul în Se micşorează inducerea citocromului P450 în microzomii hepatici. Aşa cum s-a arătat în Capitolul 7.5.1 în cursul metabolizării medicamentelor în microzomii hepatici apare în unele cazuri o peroxidare a lipidelor. Semnificaţia acestei observaţii încă este neclară, deşi s-a observat interferenţa vitaminei E în acelaşi sistem [12].

Interacţiunea Se şi vitaminei E nu se rezumă doar la coincidenţa unor stări patologice asociate cu deficit în aceşti compuşi. După Diplock [22] vitamina E ar stabiliza Se într-o formă selenit în centrii activi ai unor proteine conţinînd Fe neheminic. În astfel de formă cei doi antioxidanţi s-ar proteja reciproc. Ţinînd seama de implicarea unei Fe-proteine în metabolizarea microzomială a medicamentelor, datele experimentale expuse în paragraful precedent îşi pot găsi o explicaţie. În sprijinul aceleiaşi ipoteze se găseşte şi observarea unei creşteri a toxicităţii herbicidului paraquat în cazul unui deficit în seleniu [69].

9.1.5. COMPUŞI CONŢINÎND SULF SAU GRUPĂRI SULFHIDRIL

În Capitolul 5.3.5. s-a arătat că unele sulfuri organice acţionează ca antioxidanţi accelerînd descompunerea peroxizilor. Aminoacizii conţinînd sulf prezintă o activitate antioxidantă acţionînd prin mai multe mecanisme cum sînt sub forma selenocisteinei [13], sau prin participarea lor la biosinteza glutationului. Atît cisteina, dar mai ales glutationul sînt unele din „ţintele" preferate ale peroxizilor, iar în cursul autooxidării tiolilor se produce O^{-} [58]. Grupările SH atît libere (aparţinînd GSH), cît şi cele aparţinînd unor proteine sînt uşor oxidate de către peroxizi, astfel că existenţa lor într-o concentraţie suficientă poate proteja alţi compuşi de acţiunea peroxizilor. Acest principiu stă la baza radioprotecţiei chimice exercitate mai ales prin compuşi ce eliberează grupări SH (cistamina) ce vor reacţiona preferenţial cu peroxizii rezultaţi din acţiunea radiaţiilor ionizante asupra organismelor (Capitolul 4.4). Asupra importanţei compuşilor tiolici vom reveni cu ocazie discutării glutation peroxidazei (Capitolul 9.3) şi a consecinţelor peroxidării (Capitolul 10).

9.2. SUPEROXID DISMUTAZA

Descoperirea în 1972 de către McCord şi Fridovich [54] a superoxid dismutazei (SOD) a deschis un nou capitol în studiul oxigenului, radicalilor liberi şi peroxizilor. De atunci s-au publicat sute de lucrări despre formarea O_2^{-} în diferite reacţii chimice sau de efectul inhibitor produs prin simpla adăugare a SOD în mediul de reacţie [24, 89].

Scanned with OKEN Scanner

Așa cum s-a arătat în Capitolele 1.4 și 7.1, superoxid dismutaza (E.C.1.15.1.1.) catalizează o reacție de dismutare, prin care are loc o reducere tetravalentă a O_2 în H_2O:

$$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2 \quad (1)$$

SOD a fost de fapt cunoscută mai de mult ca o cuproproteină (în funcție de localizarea tisulară, eritrocitară, hepatică și cerebrală), crezîndu-se că servește la depozitarea locală a cuprului. De-abia în ultimii ani SOD a fost recunoscută ca cea mai importantă enzimă a vieții aerobe, depășind în acest sens citocrom oxidaza, enzima finală în respirația tisulară.

Așa cum s-a arătat în fig. 9.1, SOD este prima enzimă din lanțul enzimatic de apărare față de toxicitatea O_2 și numai prin inducerea ei acum trei miliarde de ani viața aerobă a putut să se afirme (Capitolul 7.1). Necesitatea apariției SOD provine din cauza structurii electronice a O_2, restricția de spin (Capitolele 1.1 și 1.4) favorizînd calea univalentă de reducere a O_2 cu formarea intermediară a $O_2^{\cdot-}$. Această restricție de spin poate fi depășită prin reacții în care O_2 se combină cu un metal de tranziție (Cu^{2+} sau Fe^{2+}) mai ales complexat. De aceea toate enzimele implicate în reacții directe cu O_2 au drept grupare prostetică unul din acești ioni.

Odată cu apariția O_2 pe pămînt, bacteriile anaerobe existente au trebuit să favorizeze unele sisteme de apărare contra reacțiilor (2 și 3)

$$O_2^{\cdot-} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{\text{neenzimatic}} H_2O_2 + {}^1O_2 \quad (2)$$

$$O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow OH^- + OH^{\cdot} + O_2 \quad (3)$$

ce produc specii reactive cu efecte nocive structurilor organice (Capitolul 1.4.). Aceste sisteme de apărare au avut ca punct de plecare reacția (4)

$$O_2^{\cdot-} + Me^{n+} \rightarrow O_2 + Me^{(n-1)+} \quad (4)$$

Se pare că la început a fost preferat Fe^{2+} așa cum au arătat studiile întreprinse de Halliwell (35), Fee (24), Mc Cord și Day [55]:

$$O_2^{\cdot-} + Fe^{2+} - EDTA + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + Fe^{3+} - EDTA \quad (5)$$

$$O_2^{\cdot-} + \text{citocrom c } (Fe^{3+}) \rightarrow O_2 \text{ (triplet)} + \text{citocrom c } (Fe^{2+}) \quad (6)$$

Ca dovadă s-a găsit că peroxidaza și catalaza au oarecare activitate dismutazică, iar Yost și Fridovich au izolat din *Escherichia coli* o SOD ce conține un atom de Fe^{3+} în moleculă [101]. Recent, Gregory și Moore [33] au arătat că larga toleranță a bacteriilor anaerobe față de O_2 se datorește unui conținut variabil în SOD, mai bogate fiind speciile *Bacteroides*. Descoperirea de către Keele [44] tot în *E. coli* a unei SOD ce conține Mn sugerează o selecție în alegerea unui ion metalic potrivit. Așa se explică existența SOD cu Mn la primele forme de viață aerobe (tabelul 7.1).

Scanned with OKEN Scanner

Atît SOD ce conţine Fe, cît şi cea cu Mn nu au oferit vieţii aerobe în curs de dezvoltare o protecţie suficientă, încît s-a impus SOD ce conţine Cu—Zn. Studiile lui Fee [24] au arătat că ionii de Cu^{2+} au o activitate slabă dismutazică care creşte prin complexare cu proteină. Zn^{2+} nu

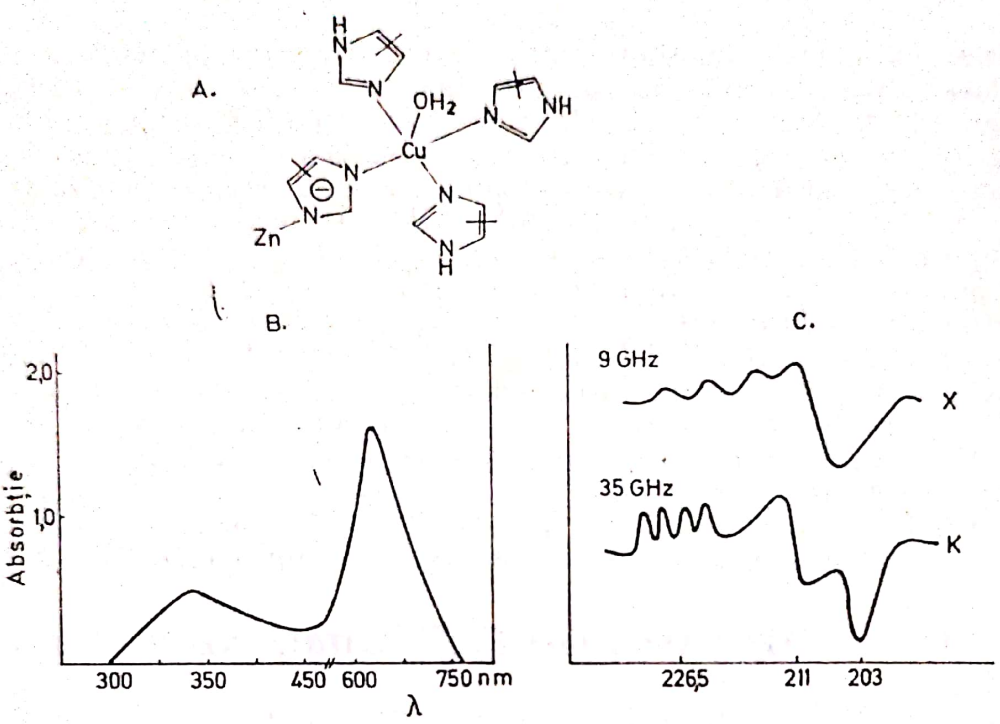


Fig. 9.3. Superoxid dismutaza din hematii de bovine. A. Structura centrului activ ; B. Spectrul optic ; C. Spectrul de rezonanţă electronică de spin (RES). După Fee [24]

participă direct în mecanismul catalitic dar potenţează capacitatea dismutazică a Cu^{2+} prin crearea unui mediu favorabil. SOD din hematii de bovine are o greutate moleculară de 31 500, conţine cîte doi atomi de Cu şi Zn şi constă din două subunităţi polipeptidice identice a 151 rezidii de aminoacizi. În fig. 9.3.A este prezentată schema centrilor activi din molecula SOD. Se observă că Zn are o poziţie tetraedrică prin legare cu trei rezidii histidină (poziţiile 61, 69, 78) şi aspartic (poziţia 81) Cu^{2+} are poziţie planară fiind coordonat cu 4 rezidii histidină (poziţiile 44, 46, 61, 118). În fig. 9.3 B şi C sînt prezentate spectrele optice şi RES ale aceleiaşi SOD. Se observă maxime de absorbţie la 350 şi 600 nm (fig. 9.3.B) şi cu valorile g ale spectrului RES indicate în fig. 9.3.B. Un amplu studiu al structurii acestei enzime este prezentat de Fee [24], CuZnSOD prezintă şi o structură tridimensională aparte. Studiile de difracţie a razelor X au arătat că fiecare subunitate apare ca un cilindru de structură β înăuntrul căruia se găsesc centrii activi [80]. Cele două subunităţi sînt legate prin legături hidrofobe, iar cei doi centri activi aşezaţi în poziţii opuse par să acţioneze independent. O faţă a poziţiei Cu este expusă solventului, pe cînd Zn este aşezat spre interiorul moleculei. În timpul reacţiei catalitice, în care Cu^{2+} trece în Cu^{+} slăbeşte legătura ionului cu rezidiile imidazol,

Scanned with OKEN Scanner

imidazolatul fiind capabil să ia un proton de la solvent. În etapa următoare, Cu^+ este reoxidat de către $O_2^{\cdot-}$, se restabileşte legătura Cu-imidazol şi H^+ este eliberat pentru a produce anionul HO_2^-. Această ipoteză atrăgătoare [27] încă nu a fost verificată experimental, mecanismul de acţiune admis pentru CuZn SOD este prezentat în reacţiile 7 şi 8, în care E reprezintă enzima i

$$E - Me^n + O_2^{\cdot-} \rightarrow E + Me^{(n-1)} + O_2 \qquad (7)$$

$$E - Me^{(n-1)} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow E - Me^n + H_2O_2 \qquad (8)$$

iar Me ionul Cu^{2+}. Se observă identitatea reacţiei generale (4) cu reacţia specializată (7). CuZnSOD este localizată în citoplasma celulelor eucariotice fiind izolată din drojdie, fungi, plante superioare, hematii şi ficat de mamifere. FeSOD şi MnSOD au fost izolate din bacterii, alge albastre şi verzi şi, în mod surprinzător, din mitocondrii la mamifere [27]. Această descoperire a furnizat baza unei ipoteze emise de Weisiger [99] după care formaţiile subcelulare au o origine simbiotică provenind din bacterii fotosintetizante, care prin dobîndirea unui sistem enzimatic pentru scindarea H_2O au creat o fotosinteză oxigenantă asemănătoare celei existente astăzi la plante. Această capacitate de utilizare a O_2 presupune o legătură funcţională şi filogenică între mitocondrie şi cloroplast, care prin reacţia catalizată de SOD vor produce H_2O_2 (Capitolul 8). În timp ce FeSOD şi MnSOD nu sînt inhibate de cianuri, CuZnSOD este sensibilă [4]. Totuşi, celulele provenind din fiinţe eucariote conţin în general CuZnSOD în citosol şi MnSOD în mitocondrii. Cele două forme sînt uşor de deosebit, deoarece CuZnSOD este inhibată de CN^-, şi este stabilă la tratare cu un amestec etanol-cloroform. Desigur că s-au găsit şi excepţii cum ar fi MnSOD izolată din inimă de bou ce are o masă moleculară de 86 000 fiind formată din 4 subunităţi legate ionic şi conţine 2 Mn per moleculă [53]. Trebuie amintit că MnSOD din mitocondrii de la mamifere şi MnSOD extrasă din bacterii au secvenţe de aminoacizi unele asemănătoare şi altele semnificativ diferite de cea a apoproteinei CuZnSOD [59].

SOD este o enzimă cu o extraordinară capacitate catalitică avînd o constantă de viteză a reacţiei cu $O_2^{\cdot-}$ de $2 \cdot 10^9\ M^{-1}\ s^{-1}$. Această valoare este apropiată de limita difuziei şi prezintă o foarte mică energie de activare; constanta scade prin creşterea viscozităţii solventului. CuZn—SOD este inhibată de CN^- avînd o constantă de inhibiţie $I_{50} = 0{,}036$ mM, de nitrili $I_{50} = 20$ mM, de dietilditiocarbamat $I_{50} = 10{,}6$ mM şi de azidă de sodiu [36]. Importanţa SOD pentru procesul de peroxidare constă nu numai în îndepărtarea excesului de $O_2^{\cdot-}$, deci indirect, dar poate acţiona şi direct prin neutralizarea O_2 în stare singlet ($^1O_2$) [100], sau chiar în inhibarea peroxidării metil linoleatului *in vitro* în prezenţa catalizatoare a citocromului P 450 [43], ori a protecţiei contra ozonului [30].

Experienţe interesante s-au efectuat [27] asupra toleranţei O_2 la organisme anaerobe. Astfel *Lactobacillus plantarum*, anaerob ce nu conţine SOD este aerotolerant, dar nu poate utiliza O_2. Expunerea unor microorganisme facultativ aerobe ca *Streptococcus faecalis*, *E. coli*, *Saccharomyces cerevisiae* la O_2 în concentraţii crescînde determină acumula-

rea unor nivele ridicate de SOD intracelular şi o toleranţă crescută la O_2 hiperbaric. Transferul celulelor din condiţii anaerobe în aerobe determină inducţia promptă a MnSOD, în schimb FeSOD era prezentă indiferent de conţinutul în O_2. Se pare că există o corelaţie între MnSOD şi rezistenţa la toxicitatea O_2. Astfel, urmărind creşterea unor culturi de *E. coli* s-a găsit că conţinutul în MnSOD creşte proporţional cu viteza respiraţiei şi corespunde rezistenţei la oxigen hiperbaric. Cînd concentraţia substanţelor nutritive a fost mărită brusc, conţinutul în SOD a crescut imediat în timp ce viteza creşterii a rămas neschimbată. Cînd nivelul SOD a atins nivelul caracteristic unui aport nelimitat în substanţe nutritive nelimitat, viteza creşterii organismelor s-a mărit brusc. În asemenea condiţii rezultă clar că viteza creşterii este limitată de nivelul intracelular de SOD [38].

Antibiotice ca streptonigrin, mitomicina-C şi porfiromicina sînt mult mai lente în prezenţa O_2 deoarece determină un ciclu de reacţii redox cu producere de O_2^-, care *in vitro* produce scindări în molecula ADN. Microorganisme ca *E. coli B* sau *K12* cu un conţinut mare în SOD sînt rezistente la acţiunea acestor antibiotice. În alte experimente s-au selectat mutanţi de *E. coli K12* pe baza intoleranţei la O_2 în urma expunerii la un mutagen. Mutanţii obligator anaerobi rezultaţi aparţineau unei categorii ce nu aveau SOD, catalază şi peroxidază sau alta ce conţineau doar SOD. Aceşti mutanţi au fost ucişi prin expunere bruscă la aer, dar o celulă din 10^4 a reuşit să supravieţuiască. Celulele care au supravieţuit îşi redobîndiseră capacităţile enzimatice lipsă sau au pierdut capacitatea de respiraţie. Acest experiment [26] indică evident o legătură genetică comună între enzimele implicate în protecţia faţă de toxicitatea O_2. Şi în cazul mamiferelor SOD este implicată în protecţia faţă de O_2 în condiţii hiperbarice. Astfel la voluntari expuşi unor condiţii de hiperoxie s-a găsit un nivel crescut al SOD în leucocite, în timp ce catalaza şi GSH peroxidaza au scăzut [90].

În timp ce valorile normale în sînge pe scara animală variază foarte mult pentru catalază şi GSH peroxidază, în cazul SOD sînt grupate între 1200—2400 unit/g hemoglobină [52]. La noii născuţi nivelul SOD este foarte mic crescînd rapid pînă în ziua 20-a cînd atinge concentraţia corespunzătoare adultului; la bătrîni se găsesc valori scăzute faţă de tineri [65]. Valori crescute de SOD în hematii se întîlnesc în trisomia 21, iar un nivel scăzut s-a găsit în anemia Fanconi [9] şi în sindromul Dubin-Johnson [77]. Nu s-a găsit în general o relaţie între variaţiile SOD şi ale celorlalte enzime implicate în protecţia faţă de toxicitatea oxigenului.

9.3. CATALAZA

Atît din reacţia (1) catalizată de SOD, cît şi din procesele prezentate în Capitolul 8 se produce H_2O_2 în organisme, fiziologic, fiind un peroxid necesar în anumite limite. Din procesele prezentate pînă acum rezultă că producerea H_2O_2 depăşeşte cu mult necesităţile, astfel că probabil, odată cu apariţia SOD, a devenit utilă o enzimă care să neutralizeze excesul de H_2O_2. Catalaza (E.C.1.11.1.6) este prezentă în toate celulele aerobe ce conţin sistemul citocromic, fiind localizată în peroxizomi şi mitocondrii.

Scanned with OKEN Scanner

Catalaza catalizează reacţia (9) extrem de eficient; un mol de

$$H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2\ H_2O \qquad (9)$$

catalază descompune $5 \cdot 10^6$ moli H_2O_2/minut. Această foarte mare viteză de reacţie a produs multe dificultăţi în stabilirea mecanismului de acţiune. Catalaza are drept grupare prostetică 4 nuclee hem ce coordonează un atom de Fe^{3+} la o masă moleculară de 248 000. Apoproteina este formată dintr-un lanţ polipeptidic per subunitate hem şi conţine 16 grupări SH, dintre care 10 apar numai după denaturare acidă. Datorită acestui conţinut mare în grupări SH, catalaza este inhibată de o serie de tioli cum sînt cisteina sau glutationul, acest din urmă compus ar putea fi unul din modulatorii activităţii enzimatice [18, 71]. Activitatea catalazică nu este inhibată prin titrarea celor 6 grupări SH, dar cea peroxidazică este mult redusă. Acţiunea GSH se datoreşte producerii unor modificări conformaţionale pe calea stabilirii unor disulfuri mixte reversibile.

Cu toate că studiile de difuzie şi ultracentrifugare au indicat omogenitatea catalazei [18], s-au descoperit doar la plante izoenzime ce variază prin numărul de subunităţi [19]. Denaturări blînde cum este liofilizarea produce disocierea catalazei în fragmente active [19]; dealtfel toate sistemele de denaturare produc fragmentări mai mult sau mai puţin reversibile sau active enzimatice.

Elucidarea mecanismului de acţiune al catalazei a prilejuit numeroase controverse [18, 84] neelucidate nici pînă astăzi complet. Mecanismul admis se bazează pe lucrările lui Chance [14] ce presupune existenţa unei grupări OH (după alţii H_2O) la a 6-a valenţă coordinativă a Fe din hem. Activitatea catalazică şi peroxidazică a catalazei începe cu formarea complexului I (verde) între prima moleculă H_2O_2 şi Fe heminic:

$$\text{Proteină-}Fe^{3+}\text{—OH} + H_2O_2 \rightarrow \text{Proteină-}Fe^{3+}\text{—OOH} + H_2O \qquad (10)$$

Complexul I are un timp de semiviaţă de 8 ms şi maxime la 670, 405 nm. Odată format, complexul I poate reacţiona pe trei direcţii arătate în fig. 9.4. În activitatea catalazică, complexul reacţionează cu a doua moleculă H_2O_2 (D_6) conform reacţiei (11) refăcînd catalaza iniţială:

$$\text{Prot.}\ \text{—}Fe^{3+}\text{—OOH} + H_2O_2 \rightarrow \text{Prot.—}Fe^{3+}\text{—OH} + H_2O + O_2 \qquad (11)$$

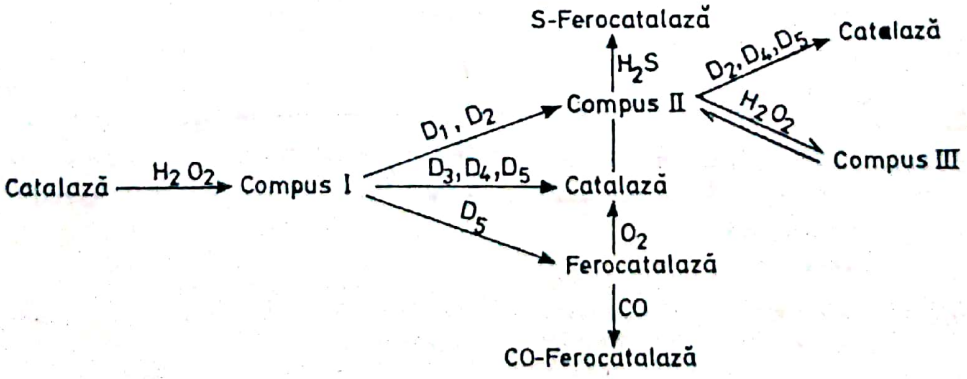


Fig. 9.4. Compuşii intermediari formaţi prin acţiunea catalazei. D_1 = ascorbat, ferocianură, D_2 = fenoli, D_3 = alcooli, format, D_4 = nitriţi, D_5 = azidă, hidroxilamină, $D_6 = H_2O_2$. După Deisseroth [19].

Scanned with OKEN Scanner

În activitatea peroxidazică, catalaza necesită prezența unui donor de hidrogen (AH_2) producînd complexul II, roșu, inactiv, conform reacției:

$$\text{Prot.}-Fe^{3+}-OOH + AH_2 \xrightarrow{K_7} \text{Prot.}-Fe^{3+}-OH(II) + A + H_2O \quad (12)$$

Astfel de donori sînt ascorbatul, fenoli, ferocianură. Se admite că activitatea catalazică predomină la concentrații de $H_2O_2 > 10^{-4}M$ și cînd enzima este în cantitate mare (hematii). Activitatea peroxidazică necesită concentrații mai mici, prezența unui donor sau substraturi diferite ca peroxizi alchilici inferiori. Dacă H_2O_2 este generat continuu în concentrație mică (reacția glucoză-glucozo oxidază) turnoverul reacției generale este la fel de mare, deoarece acționează ambele mecanisme, căci a doua moleculă de H_2O_2 poate juca rol de donor în reacția (12).

În afară de acțiunea principală, catalazică, în care catalaza este în competiție cu GSH peroxidaza, reacțiile peroxidazice ale acestei enzime par să fie utilizate în multe procese biochimice cum sînt metabolizarea alcoolului etilic (fig. 9.5), activitate antimicrobiană asociată fagocitozei [69], metabolizarea vitaminei K_3 [70]. Ținînd seama că mai ales în ficat H_2O_2 este generat continuu în concentrații mici ($10^{-8}M$) probabil că în acest organ catalaza acționează peroxidazic [73].

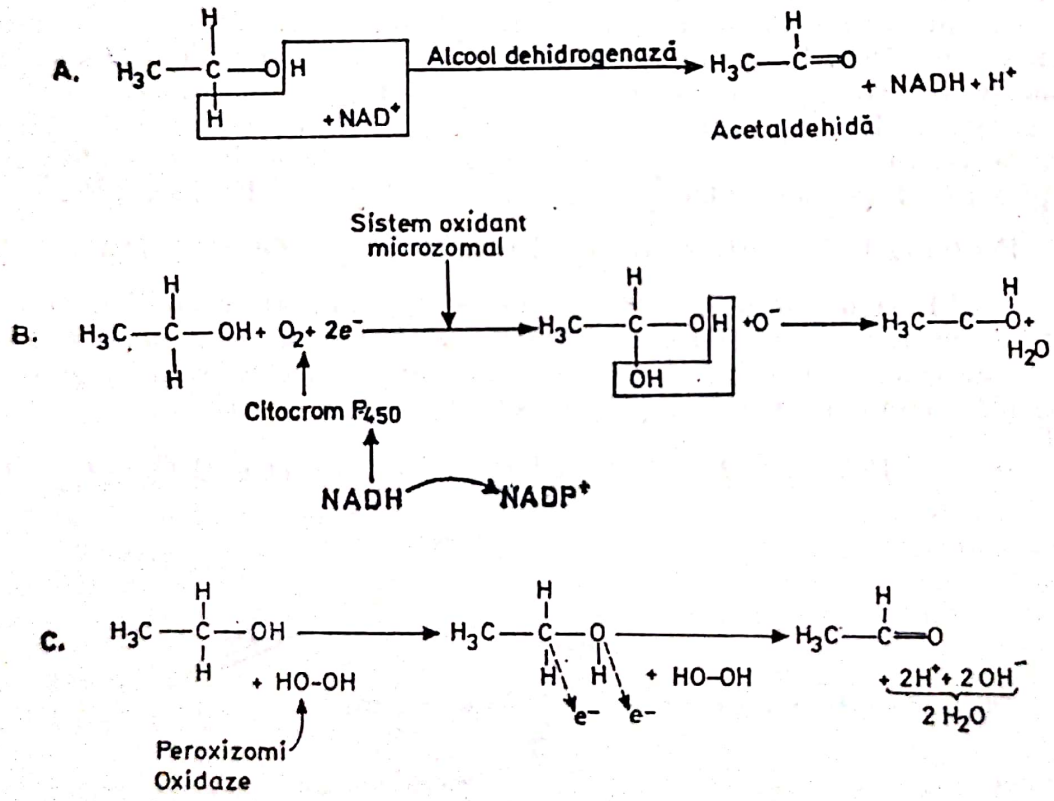


Fig. 9.5. Cele trei căi de metabolizare ale alcoolului etilic. A. alcool dehidrogenaza, B. Sistemul hidroxilant microzomal C. catalaza.

Acatalazemia este o deficiență congenitală autosomală, care produce uneori leziuni granulomatoase ale cavității nazale și bucale, atît la homozigoți, cît și la heterozigoți, datorită dezvoltării unor pneu-

mococci și streptococci hemolitici ce nu posedă catalază, și produc H_2O_2 ce prin difuzie determină methemoglobinemie și necroză tisulară. Boala nu este gravă, căci din cauza eficienței catalazei, chiar și 1% este suficientă pentru a contribui la îndepărtarea excesului de peroxid.

9.4. PEROXIDAZE

Grupate sub același nume de peroxidaze (E.C.1.11.1.7.) se găsesc larg răspîndite la organismele aerobe unele hemoproteine, cu o masă moleculară de 40 000, ce catalizează reacția generală (13):

$$H_2O_2 + AH_2 \rightarrow 2\ H_2O + A \qquad (13)$$

Mecanismul de acțiune al peroxidazelor presupune identitatea primelor două reacții cu cele ale catalazei (10 și 12), după care mai are loc o reacție finală (14), în care se reface peroxidaza și se oxidează substratul-donor

$$\text{Complex II} + AH_2 \xrightarrow[k_4]{} \text{Prot}-Fe^{3+}-OH + AH \qquad (14)$$

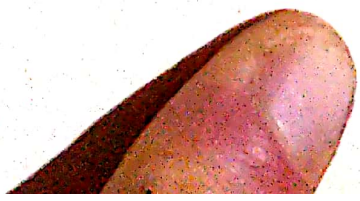
de hidrogen. În cazul peroxidazelor, complexul I se transformă chiar spontan în complex II, datorită probabil unui donor endogen variind mult cu puritatea enzimei. Ca și în cazul catalazei, se poate obține și un complex III (fig. 9.4) în prezența unui exces de H_2O_2. Acesta are un spectru asemănător cu cel al methemoglobinei și la mieloperoxidază [67] se datorește acțiunii reducătoare a $O_2^{\cdot-}$ format în cursul reacției. Mecanismul de acțiune și proprietățile peroxidazelor, mai ales a celei din hrean (HPx) au fost amplu studiate și prezentate [11, 60, 83].

Problema principală, încă nerezolvată, a peroxidazelor este elucidarea naturii și rolului donorului de hidrogen din reacția generală (13). Studiile clasice [19] indică în primul rînd o serie de compuși aromatici (hidrochinonă, rezorcinol, pirogalol, fenilen diamine, anilină) pentru care valoarea constantei k_4 (reacția 14) este în jur de $10^6\ M^{-1}\ s^{-1}$. Determinarea activității peroxidazei de tip (HPx) se bazează pe această reacție. De asemenea rolul peroxidazei la plante a fost explicat prin participarea ei la oxidarea unor fenoli ce se acumulează în cursul creșterii și diferențierii [86]. La această reacție prezența ionilor Mn^{2+} este necesară, formînd astfel un sistem cuplat de reacții. Un astfel de sistem poate oxida în plus acizi organici (oxalic, piruvat, oxalacetic).

Cu anumiți donori de hidrogen (NADH, NADPH, acid dihidroxifumaric DHF, acid indolacetic AIA), peroxidaza acționează ca o oxigenază, activînd O_2.

$$O_2 + \text{DHF} \xrightarrow{\overline{HPx}} 2\ H_2O + \text{dihidroxitartrat} \qquad (15)$$

În cursul reacției se dezvoltă $O_2^{\cdot-}$ și H_2O_2 [37]. Reacția cu AIA este foarte importantă deoarece acest compus acționează ca hormon la plante, iar unii din produșii rezultați (3-metilenoxiindol) sînt inhibitori ai creșterii microorganismelor și plantelor [98].



Scanned with OKEN Scanner

Halogenările catalizate de peroxidaze, menţionate în Capitolul 8.3 au furnizat subiect numeroaselor lucrări [95], mai ales legate de iodurarea tirozinei, insulinei şi altor proteine. Rolul peroxidazei în biosinteza tiroxinei este prezentat în fig. 9.6, dar mecanismul iodurării nu este încă cunoscut. Toate tipurile de peroxidaze pot cataliza reacţia de iodurare, mai activă fiind lactoperoxidaza. Iodurarea proteinelor a devenit o metodă

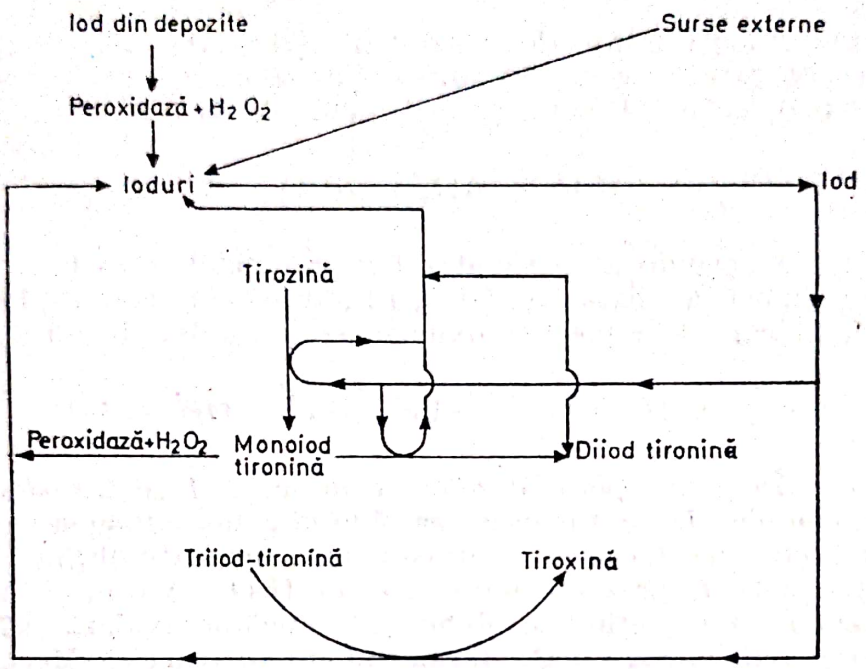


Fig. 9.6. Biosinteza tiroxinei şi rolul peroxidazelor [83]

curentă de „marcare" folosită la studiul structurii şi metabolizării lor. Reacţia de iodurare catalizată de peroxidaze produce şi efecte secundare cum ar fi oxidarea grupărilor SH proteice [2].

Rolul fiziologic al peroxidazei localizate în uter este încă neclar. În fig. 9.7. este prezentată schema inducţiei acestei peroxidaze de către hormonul luteinizant, participarea ei la biosinteza progesteronei (fig. 9.7.A) şi relaţia inversă cu concentraţia ascorbatului (fig. 9.7. B). Pe de altă parte peroxidaza contribuie la catabolismul hormonilor estrogeni prin inactivarea lor în urma conjugării cu GSH [8], catalizînd legarea acestor hormoni de proteine şi acizi nucleici [57], sau contribuind la producerea unor produşi hidrosolubili [42].

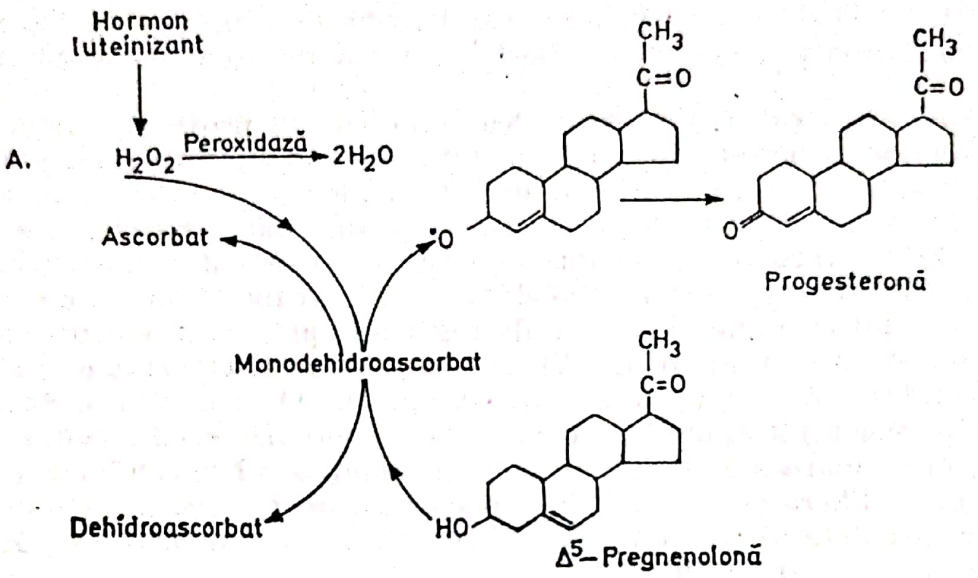
Peroxidazele mai sînt implicate în producerea melaninei [68], degradarea oxidativă a bilirubinei [7], peroxidarea acizilor graşi, oxidarea unor aminoacizi (triptofan) şi amine [6].

Determinarea peroxidazei (tip HPx) la seminţe, plante sau la animale a adus numeroase rezultate confuze datorită varietăţii materialului şi a diferenţelor tehnice, dar care indică relaţii între peroxidază şi capacitatea germinativă a plantelor, avînd un rol modulator în creştere şi diferenţiere [3, 83], explicabil prin reglarea nivelului de polifenoli. În schimb creşterea peroxidazei, atît la plante, cît şi la animale în urma unor

Scanned with OKEN Scanner

infecţii bacteriene sau virotice [79, 97] se poate explica destul de vag, fie prin intensificarea fagocitozei sau prin reacţia generală şi nespecifică a organismelor în cazul unui stress [47].

Peroxidaza are aplicaţii industriale şi clinice reduse. În schimb în cercetarea medicală este larg folosită conjugarea peroxidazei cu imunoglobuline sau alte proteine pentru detecţia antigenilor microscopic



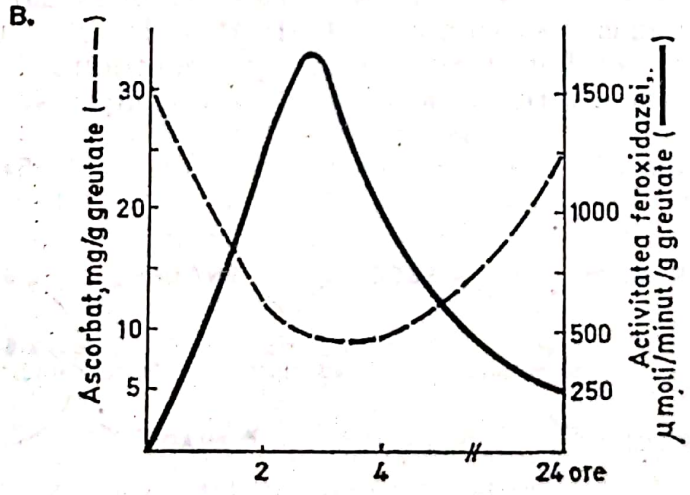


Fig. 9.7. Rolul peroxidazei uterine. A. Schema ipotetică a mecanismului peroxidazic al steroidogenezei luteale B. Variaţia ascorbatului din ovar înainte de oestrus şi atingerea maximului la dioestrus. După Agrawal [2].

[45, 60]. Demnă de menţionat este metoda propusă de Deutsch şi colaboratorii [20] pentru legarea ireversibilă a compuşilor morfinei de proteine în urma cuplării cu reacţia (13) catalizată de peroxidază, utilă în studiul interacţiei medicament-receptor.

Scanned with OKEN Scanner

9.5. GLUTATION PEROXIDAZA

Ultima enzimă din sistemul protector arătat în fig. 9.1 este glutation peroxidaza (GSH Px, E.C.1.11.1.9.) care catalizează reacţia (16):

$$R{-}OOH + 2\ GSH \rightarrow R{-}OH + GSSG + H_2O \qquad (16)$$

în care R poate fi H, acid gras nesaturat sau unii steroizi [51] ori baze pirimidinice [16]. Deci GSH Px catalizează descompunerea unei largi game de peroxizi începînd cu H_2O_2 prin reacţie cu glutationul redus, GSH.

GSH peroxidaza reprezintă cea mai eficientă protecţie faţă de peroxidare avînd următoarele avantaje faţă de sistemele descrise anterior: a) combină capacităţile antioxidante ale tiolilor şi ale seleniului, b) produsele reacţiei nu sînt radicali liberi ci substanţe hidrosolubile, uşor metabolizabile, c) cuprinde toate felurile de peroxizi existenţi în medii biologice, d) al doilea substrat, GSH, este cel mai mobil compus tiolic, fiind prezent în toate celulele animale şi uşor de regenerat prin şuntul pentozofosfat, aşa cum este prezentat în fig. 9.8, e) descompune H_2O_2 mult mai eficient decît catalaza. Aşa cum au arătat studiile lui Oshino [74] şi Sies [88], datorită concentraţiei mari de catalază din peroxizomi şi a vitezei constante de formare a H_2O_2 se va acumula compusul I în echilibru dinamic cu catalaza liberă şi peroxid în concentraţii mici. Aceasta este una din cauzele care determină valori mari ale constantei K_m de 0,05 — 1,0 M H_2O_2 pentru activitatea catalazică.

Competiţia pentru H_2O_2 dintre catalază şi GSH peroxidază a produs multe controverse. Astfel Nicholls [62] susţine că în hematie ar predomina activitatea catalazică susţinută de GSH Px. În ficat, datorită numeroaselor procese metabolice ce produc H_2O_2 continuu, dar şi reducători posibili (acizi formic, piruvic) se va produce o competiţie pentru peroxid

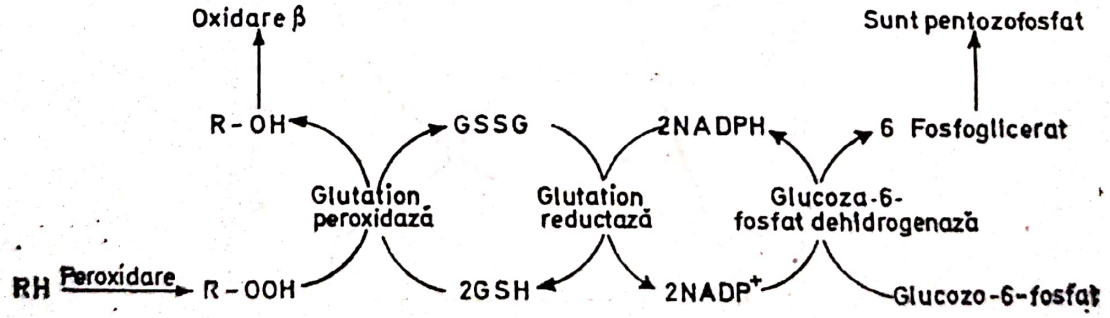


Fig. 9.8. Interrelaţii între reacţiile catalizate de GSH peroxidază, GSH reductază, şuntul pentozofosfat şi peroxidare. RH = acid gras polinesaturat.

între cele două enzime, din care catalaza poate acţiona catalazic şi peroxidazic. Nicholls a încercat o justificare a valorilor foarte mari pentru K_m faţă de GSH ale GSH Px (între 3—10 mM). Admiţînd că concentraţia GSH este limitantă pentru activitatea GSH Px, conform relaţiei (17)

$$v = 2\ k_2\ [GSH]\ [enzimă] \qquad (17)$$

Scanned with OKEN Scanner

în care v reprezintă viteza descompunerii peroxidului, se pot obține valori apropiate de cele determinate experimental. Aceasta înseamnă că în final concentrația GSH din celulă va orienta activitatea enzimei, cu atît mai mult cu cît GSH poate inactiva catalaza [71]. Dealtfel și mecanismul cinetic al GSH Px de tip „ping pong" [25, 50] permite enzimei o activare rapidă la concentrații mici de peroxid.

Cinetica complicată a GSH Px se datorește influenței reciproce a celor două substraturi [18, 50] din reacția (16). Descoperirea Se ca parte componentă a enzimei (Capitolul 9.1.4) a complicat și mai mult înțelegerea mecanismului de acțiune. Studii recente [48, 78] au arătat existența a două GSH Px, dintre care numai una conține Se. GSH Px ce nu conține Se nu este influențată de aportul acestui element în dietă și deși poate descompune H_2O_2 prezintă o mai mare afinitate pentru peroxizi organici pentru care are aceleași valori mici ale constantei K_m (nM) ca și enzima ce conține Se. Distribuția celor două enzime indică o răspîndire mai largă a GSH Px ce conține Se [4], dar care nu este paralelă cu conținutul în Se. În plus, în ficatul de șobolan predomină GSH Px cu Se, în timp ce la oaie raportul este inversat. Așa se explică de ce la oi nu se observă necroză hepatică în caz de insuficient aport de Se în dietă, cum se produce la șobolan. După Pierce și Tappel [78], GSH Px care conține Se catalizează și conjugarea GSH cu 1-cloro-2,4-dinitrobenzen fiind asemănătoare în această privință cu GSH transferaza (E.C.2.5.1.13), enzimă implicată în detoxifierea unor compuși aromatici și în formarea acizilor mercapturici. Ambele enzime au aceeași localizare în ficat și rinichi.

Existența a două GSH Px, dintre care numai una conține Se, care însă pot fi determinate cu aceeași metodă analitică [78], cît și activitatea transferazică a GSH Px-Se sugerează posibilitatea formării mai multor forme multiple. Deși majoritatea GSH Px purificate pînă în prezent au mase moleculare în jur de 80 000 s-a comunicat purificarea unei GSH Px-Se cu o masă moleculară de 35 000 formată din două subunități de 17 000 [4]. Stults și colaboratorii [92] au arătat că GSH Px imediat după purificare este neutră electric, dar se încarcă electronegativ prin păstrare, modificîndu-și stabilitatea. Așa se explică și influența unei contaminări cu hemoglobină asupra proprietăților chimice și a cineticei enzimei [25 72].

Studiile (48, 59, 64) privind distribuția GSH Px în țesuturi au arătat că activitatea enzimatică cea mai bogată este în hematii, glanda suprarenală, ficat și splină, moderată în inimă, plămîni și rinichi și slabă în creier, intestin. Niță și Olinescu [64] au arătat că activitatea enzimatică dintr-un organ depinde și de conținutul în GSH care variază aproximativ paralel. În creier și intestin GSH Px nu găsește condiții optime de activitate, ceea ce probabil determină o activitate bogată în SOD.

GSH Px este esențială mai ales hematiei, protejînd membrana celulară de oxidare distructivă exercitată de H_2O_2 (de fapt are loc o acțiune comună a tuturor sistemelor protectoare pentru a face față și altor specii reactive ale O_2). În fig. 9.9, se prezintă schematic rolul GSH Px în protecția hematiei. Astfel $O_2^{\cdot-}$ format prin acțiunea unor medicamente asupra hemoglobinei determină crearea unui „*pool*" de O_2 activat ($O_2^{\cdot-}$, $^1O_2$, $OH^{\cdot}$) ce produce ulterior H_2O_2. Peroxidul determină activarea GSH

Scanned with OKEN Scanner

Px atît catalitică, cît şi alosterică [50], prin implicarea GSH. GSH Px mai poate fi activată prin aport de Se din plasmă [34, 61].

Deficitul congenital în GSH Px determină în primul rînd o anemie hemolitică asociată sau nu şi cu alte modificări hematologice (hemoglobinurie, coagulare intravasculară). Anemia hemolitică a noului născut

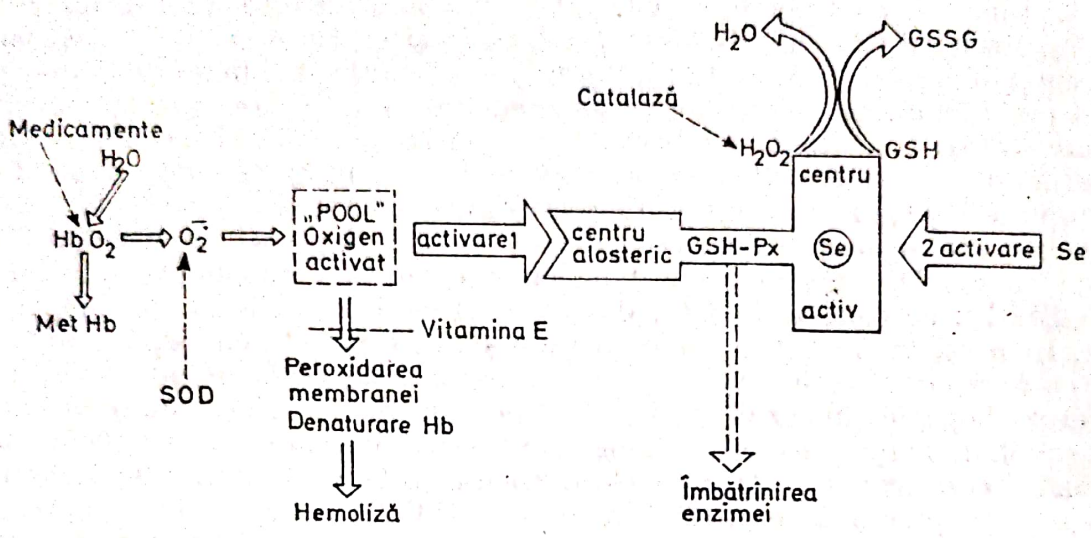


Fig. 9.9. Schema ipotetică a modulării activităţii GSH peroxidazei în hematie. Se prezintă cele două feluri de activare a enzimei, relaţiile cu peroxidarea membranei şi locul acţiunii celorlalte sisteme de protecţie. După Perona [76]

pare să fie datorită aceleiaşi cauze, poate neereditare, deoarece în acest caz toate enzimele implicate în protecţia faţă de toxicitatea O_2 sînt scăzute [26]. Recent Perona şi colaboratorii [76] au arătat că activitatea GSH Px din hematii şi reticulocite variază mult în funcţie de vîrsta celulei şi de activarea enzimei *in vivo* prin Se din dietă, aceasta avînd loc în măduvă.

Fig. 9.9 se poate completa cu fig. 9.8 în sensul înţelegerii necesităţii asigurării unei continue regenerări a GSH. GSH Px este ajutată şi de catalază, astfel că în toate cazurile de insuficienţă a GSH Px se notează o creştere a activităţii catalazei. Hematiile de raţă conţin mai puţin de 1% catalază comparativ cu alte specii, în schimb sînt bogate în GSH Px şi GSH. Activitatea scăzută a GSH Px şi catalazei în unele organe (creier, testicule, intestin) poate fi compensată şi prin circulaţia intensă a sîngelui ce asigură prin hematii îndepărtarea excesului de H_2O_2.

Valori crescute ale GSH Px s-au observat în ateromatoză, scleroză multiplă, distrofie musculară, trisomia 21 (sindrom Down). Valori scăzute s-au găsit în kwashiorkor şi în trombocitopenia Glanzmann. Nu se ştie dacă aceste variaţii au o legătură cu etiologia bolii respective [5, 91].

Urmele de ozon din atmosferă, poluanţi din atmosferă (NO_2), din alimentaţie (nitrozoamine, peroxizi, metale), unele medicamente în cantitate mare sau toxice (CCl_4) determină creşteri ale activităţii GSH Px atît la om, cît şi la animale, solicitînd capacitatea de protecţie a sistemelor de protecţie faţă de toxicitatea oxigenului [27, 95].

BIBLIOGRAFIE

1. H. ABRAMSON, *J. Biol. Chem.*, **178**, 179 (1949).
2. P. AGRAWAL, M. M. LALORAYA, *Biochem. J.*, **166**, 205 (1977).
3. P. G. ARNSON, W. G. BALL, *Can. J. Bot.*, **54**, 1847 (1976).
4. K. ASADA, S. KANEMATSU, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **179**, 243 (1977).
5. R. R. BELL, H. H. DRAPER, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **152**, 520 (1976).
6. C. J. BROCK în „Metalloenzymes Proc. Symp." edit. G.J. Leigh, Avi Ltd. London, p, 1985 1977.
7. R. BRODERSEN, *Scand. J. Lab. Clin. Invest.*, **39**, 143 (1979).
8. J. BROKELMAN, *J. Histochem. Cytochem.*, **17**, 394 (1969).
9. K. W. BROWN, D. G. HARDEN, *Lancet*, **II**, 1260 (1978).
10. R. F. BURK, B. S. MASTERS, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **170**, 124 (1975).
11. R. F. BURK, K. NISHIKI, R. A. LAWRENCE, *J. Biol. Chem.*, **253**, 43 (1978).
12. M. P. CAMENTER, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, **203**, 81 (1972).
13. K. A. CARDWELL, A. L. TAPPEL *Biochemistry*, **3**, 1643 (1964).
14. B. CHANCE, D. S. GREENSTEIN, F. ROUGHTON, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **37**, 301 (1952).
15. M. CHIARIOTTI, D. G. GUSTI, *Experientia*, **35**, 90 (1979).
16. B. O. CHRISTOPHERSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, **186**, 387 (1969).
17. G. F. COMBS, M. L. SCOTT, *Bioscience*, **27**, 467 (1977).
18. A. CRISTEA, E. TOMAS, R. OLINESCU, „Procese bioenergetice şi oxidoreducerea enzimatică", Editura Ştiinţifică, Bucureşti, cap. 3, 4, 1973.
19. A. DEISSEROTH, A. L. DOUNCE, *Physiol. Rev.*, **50**, 319 (1970).
20. M. J. DEUTSCH, D. L. ROERIG, R. H. WANG, *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 1267 (1977)
21. C. J. DILARD, A. L. TAPPEL, *Lipids*, **8**, 183 (1973).
22. A. T. DIPLOCK, J. A. LUCY, *FEBS Lett.*, **29**, 205 (1973).
23. J. DUSCHENE, R. GILES, F. MOSORA, *C.R. Acad. Sci.*, **281**, 945 (1975).
24. J. A. FEE în „Superoxide and Superoxide Dismutases", edit. A.M. Michelson, J.M.Mc Cord, I. Fridovich, Academic Press, London, p. 173 1977.
25. L. FLOHE, *Klin. Wochen.* **49**, 669 (1971).
26. I. FRIDOVICH, *Annu. Rev. Biochem.*, **14**, 147 (1975).
27. I. FRIDOVICH, *Science*, **201**, 875 (1978).
28. C. H. FOYER, B. HALLIWELL, *Phytochemistry*, **16**, 1075 (1974).
29. T. A. GASIEWICZ, J. C. SMITH, *Chem. Biol., Interact.*, **21**, 885 (1975).
30. B. D. GOLDSTEIN, M. G. ROSEN, *Biochem. Pharmacol*, **28**, 27 (1979).
31. J. GREEN, A. T. DIPLOCK, J. BUNYAN, *Nature*, **190**, 318 (1961).
32. J. GREEN, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, **203**, 29 (1973).
33. E. M. GREGORY, W. E. MOORE, *Archiv. Environm. Microbiol.*, **35**, 988 (1978).
34. S. GROSS, *Seminars in Hematology*, **13**, 187 (1976).
35. B. HALLIWELL, *New Phytologist*, **73**, 1075 (1974).
36. B. HALLIWELL, *FEBS Lett.*, **72**, 8 (1976).
37. B. HALLIWELL, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 757 (1978).
38. H. M. HASAN, I. FRIDOVICH, *J. Bacteriol.*, **130**, 805 (1977).
39. W. G. HOEKSTRA, D. HAFEMAN, S. A. OH, *Fed. Proc.*, **32**, 885 (1973).
40. M. K. HORWITZ, *Am. J. Clin. Nutrit.*, **27**, 1182 (1974).
41. H. S. JACOB, J. L. JANDL, *J. Clin. Invest.*, **44**, 1187 (1965).
42. P. H. JELLINECK, S. CLEVELAND, *Can. J. Biochem.*, **56**, 203 (1978).
43. K. KAMEDA, T. ONO, *Biochim. Biophys. Acta*, **572**, 77 (1979).
44. B. B. KEELE, J. M. MC CORD, I. FRIDOVICH, *J. Biol. Chem.*, **245**, 6176 (1970).

Scanned with OKEN Scanner

91. L. STANKOVA, D. A. RIGAS, R. BRIGLEY, *J. Reticul. Soc.*, **21**, 97 (1977).
92. F. H. STULTS, J. W. FORSTER, D. T. CHU, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **183**, 490 (1977).
93. C. SYLVESTER, J. GLAVIND, *Int. J. Vitamin. Nutrit. Res.*, **47**, 1 (1977).
94. A. L. TAPPEL, *Am. J. Clin. Nutrit.*, **27**, 960 (1974).
95. E. L. THOMAS, T. M. AUNE, *Biochemistry*, **16**, 3581 (1977).
96. R. G. THURMAN, *Fed. Proc.*, **36**, 1640 (1977).
97. J. A. VEECH, *Phytopathology*, **66**, 1072 (1976).
98. C. C. VIDIGAL, K. ZUMER, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **65**, 138 (1975).
99. R. A. WEISIGER, I. FRIDOVICH, *J. Biol. Chem.*, **248**, 3587 (1973).
100. U. WESER, W. PASCHEN, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **66**, 769 (1975).
101. F. J. YOST, I. FRIDOVICH, *J. Biol. Chem.*, **248**, 4908 (1973).
102. V. G. ZANNONI, M. M. LYNCH, *Drug. Metabolism Rev.*, **2**, 57 (1973).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 10

STĂRI PATOLOGICE I (PEROXIZI LIPIDICI)

Acţiunea speciilor reactive ale oxigenului asupra organismelor vii începe la nivel molecular datorită existenţei unor substanţe mai susceptibile. Substraturile favorabile peroxidării au fost prezentate, atît pentru medii nebiologice (Capitolul 3.1), cît şi pentru organismele vii (Capitolul 7.3), şi în linii mari coincid. Astfel, acizii graşi polinesaturaţi (AGPN) sînt cuprinşi în ambele categorii, constituind substratul cel mai favorabil peroxidării, urmaţi într-o oarecare măsură de bazele pirimidinice ale acizilor nucleici. Din această cauză, membranele celulare, în a căror componenţă intră AGPN şi aparatul genetic celular bazat pe acizi nucleici vor fi principalele „ţinte" ale peroxizilor.

Spre deosebire de medii nebiologice, aşa cum s-a arătat la începutul Capitolului 9, organismele vii s-au adaptat efectelor toxice ale O_2 dezvoltînd sisteme multiple şi foarte eficiente de protecţie. În consecinţă, balanţa dintre factorii prooxidanţi şi sistemele de protecţie este mult deplasată spre acestea din urmă şi deci fiziologic nu pot fi detectate decît urme de peroxizi (lipidici sau pirimidinici), cu excepţia H_2O_2, a cărui exces este eficient şi multilateral îndepărtat (Capitolul 9). Prezenţa în organismul viu a unor peroxizi lipidici în cantitate mai mare ar indica o stare patologică avansată şi poate ireversibilă.

După cum s-a arătat în mai multe ocazii (Capitolele 1.3 ; 7.1 ; 9.1), dar mai ales în fig. 9.1, toxicitatea O_2 începe din momentul activării, deoarece radicalii intermediari trec uşor unul în altul şi în al doilea rînd fiecare poate iniţia o reacţie în lanţ autooxidant (Capitolul 1). De aceea pentru fiecare specie reactivă menţionată în fig. 9.1 există cel puţin un sistem enzimatic de protecţie cu excepţia radicalului hidroxil, $OH^{\cdot}$. Acest radical formează uşor peroxizi lipidici, fiind generat într-o reacţie larg răspîndită în organisme aşa cum este cea catalizată de xantin oxidază [85]. Din fericire, formarea $OH^{\cdot}$ în cantitate suficientă presupune depăşirea celorlalte sisteme protectoare, eveniment greu de realizat *in vivo*, dar nu şi imposibil. Pînă în prezent cel mai bine se cunosc modificările la nivel molecular exercitate de unele forme activate ale O_2 sau mai ales de peroxizi. Deoarece în etapa actuală de dezvoltare a medicinei, legătura cauzală între modificările la nivel molecular şi semnele clinice este numai în unele cazuri admisă unanim, interpretarea unor creşteri a peroxizilor sau a unor scăderi în sistemele de apărare asociată cu unele stări patologice este dificilă. Formarea în cantitate mai mare a peroxizilor poate fi doar o consecinţă a stării patologice şi nu un factor etiologic. Un exemplu foarte elocvent este recenta observare a creşterii peroxizilor lipidici în serul femeilor gravide şi mai ales cu graviditate toxică. În fig. 10.1. se observă că apariţia peroxizilor în ser coincide cu o scădere corespunzătoare a AGPN şi

Scanned with OKEN Scanner

cu creşterea altor fracţiuni ale metabolismului lipidic. Studiul exigent a lui Ishihara [36] este convingător din punct de vedere tehnic, dar nu oferă vreo interpretare biochimică sau clinică. Cel mult sugerează profunda modificare a metabolismului lipidic ce se produce în graviditate, intensifi-

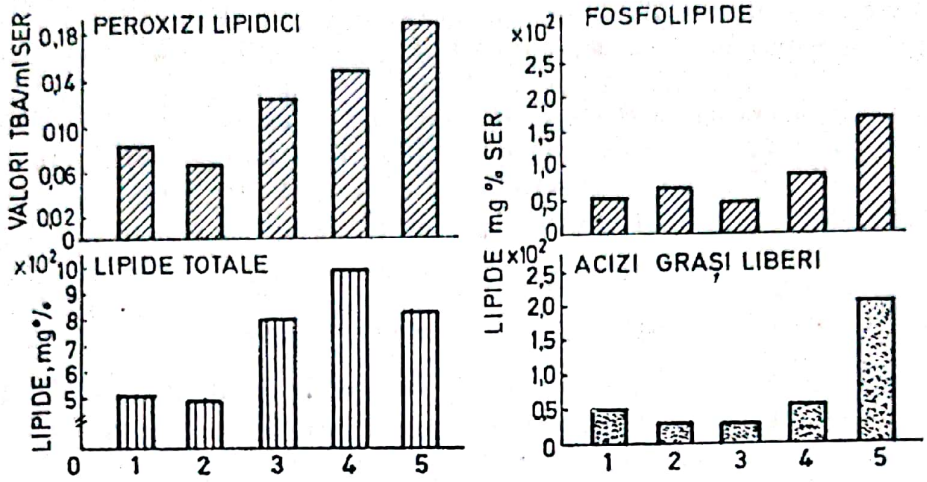


Fig. 10.1. Variaţia peroxizilor lipidici (ca absorbţie a reacţiei cu acidul tiobarbituric, TBA), lipidelor totale, fosfolipidelor şi acizilor graşi liberi din ser la femei negravide (1), gravide în trimestrul I (2), trimestrul II (3), trimestrul III (4) şi toxicitate gravidică (5). După Ishihara [36].

carea lui în toxemia gravidică şi apariţia certă a peroxizilor lipidici. Acest exemplu ilustrează posibilitatea depăşirii sistemelor de protecţie chiar în stare fiziologică (graviditate) şi intensificarea formării peroxizilor pe măsura trecerii spre o stare patologică (toxemie).

10.1. OXIDAREA GRUPĂRILOR SULFHIDRIL (SH)

Odată formaţi, speciile activate ale O_2 sau peroxizii vor ataca rapid o serie de molecule sau grupări chimice aflate în vecinătate. Grupările SH sînt foarte răspîndite în toată arhitectura celulară şi vor fi printre primele molecule atacate. În ultimii ani, rolul biochimic al grupărilor SH este din ce în ce mai studiat. În timp ce tiolii simpli ca glutationul (GSH) sau cisteina au o funcţie regulatorie, grupările SH ale enzimelor sau proteinelor sînt implicate în cimentarea structurii interne sau în unele procese biosintetice [39].

O primă acţiune, atît a formelor activate ale oxigenului (O), cît şi a peroxizilor este de a produce formarea radicalului tiil, RS',

$$RSH + (O) \rightarrow RS' \qquad (1)$$

Astfel, Little şi O'Brien [47] au arătat că oxidarea diferitelor clase de tioli este invers proporţională cu valorile constantei pK de ionizare. În timp ce sub acţiunea H_2O_2, se produc mai ales disulfuri, datorită reacţiei (2) cu constante de viteză mici între 0,1—1 $M^{-1} s^{-1}$ [47],

$$RS' + RS' \rightarrow RSSR \qquad (2)$$

Scanned with OKEN Scanner

peroxizii determină oxidarea mai departe a tiolilor simpli în acizi sulfenici RSOH, sulfinici RSO_2H, sulfonici RSO_3H [3]. Deoarece în

$$RS' + (O) \rightarrow RSOH,\ RSO_2H,\ RSO_3H \qquad (3)$$

reacţia (2) se consumă 1 mol SH/echivalent oxidant, iar în reacţia (3) numai 0,5 mol SH/echivalent oxidant, peroxizii lipidici sînt mult mai eficienţi în oxidarea grupărilor SH. În cazul H_2O_2, reacţia (2) cu GSH este foarte înceată şi trebuie catalizată de GSH peroxidază (Capitolul 9). În primele două stadii de oxidare, RSSR şi RSOH, acţiunea peroxizilor este reversibilă, atît prin acţiunea protectoare a GSH peroxidazei, cît şi prin reacţii de interschimb $SH \rightleftharpoons SS$, datorite mai ales GSH ce constituie o rezervă de grupări SH mobilă. Reacţiile (4) şi (5) au fost

$$RSOH + GSH \rightarrow RSSG + H_2O \qquad (4)$$

$$RSSR + GSH \rightarrow RSSG + RSH \qquad (5)$$

evidenţiate atît în cazul unor proteine sau enzime [3, 39], cît şi în medii mai complexe cum ar fi hematia sau omogenat de ficat [39, 60]. Reacţiile (2—5) sugerează, teoretic, că atît timp cît RSH este într-o cantitate suficientă, acţiunea oxidantă a peroxizilor poate fi reparată neenzimatic prin reacţii de interschimb. Ţinînd seama de glutationul în formă redusă, GSH, este răspîndit aproape în toate celulele aerobe în concentraţii relativ mari (0,1 — 7 mM); în hematie, ficat şi ochi, în care şansele de peroxidare sînt mari concentraţia GSH variază între 5—7 mM. Regenerarea GSH se face cu ajutorul glutation reductazei, prin mecanismul arătat în fig. 9.8. Implicarea GSH atît în protecţie (GSH peroxidază), cît şi în

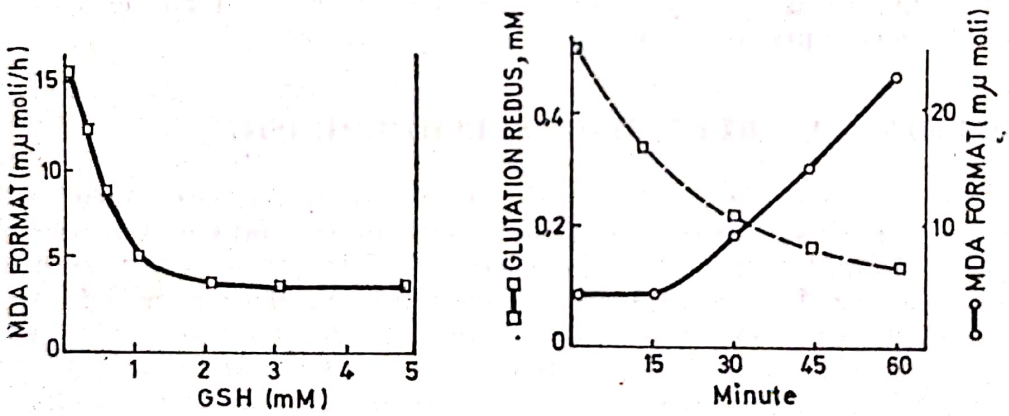


Fig. 10.2. Oxidarea intracelulară a glutationului redus (GSH) într-o suspensie de microzomi (12 mg proteină) în tampon fosfat *p*H 7,4 şi incubată diferite perioade de timp (stînga). Concentraţia iniţială în GSH a fost de 1,2 mM. S-a determinat concentraţia GSH (— — —) şi formarea malon dialdehidei (MDA) ca măsură a peroxidării (0————0). În dreapta, în aceleaşi condiţii s-a variat concentraţia GSH. După Jocelyn [38].

refacere în urma acţiunii peroxizilor este ilustrat şi de peroxidarea produsă în omogenate tisulare, în special de ficat. Astfel Christophersen [13] a arătat că producerea peroxizilor lipidici în omogenat de ficat (determinată ca malon dialdehidă) se produce numai în urma oxidării GSH, a epuizării lui, aşa cum se observă în fig. 10.2.

Scanned with OKEN Scanner

Jocelyn [38] și Olinescu [60] au arătat că oxidarea GSH ce permite peroxidarea AGPN, se datorește cuplării acestei reacții cu cea catalizată de xantin oxidază, prin care purinele trec în acid uric (6).

Hipoxantina (xantina) $\xrightarrow{\text{xantin oxidaza}}$ Acid uric (6). Așa cum s-a mai menționat anterior (Capitolul 7.2) în reacția (6) se generează aproape toate formele active ale O_2, de la $^1O_2$, $O_2^{\cdot-}$ la H_2O_2 și $OH^{\cdot}$. De aceea reacția catalizată de xantin oxidază pare a fi mai degrabă un generator de oxidanți necesari organismului, a căror formare este reglată foarte eficient atît prin sistemele protectoare, cît și prin concentrația intracelulară în GSH [60].

Studiind vitezele de oxidare a tiolilor sau a proteinelor ce conțin grupări SH de către peroxizi, Little și O'Brien [48] au găsit că acestea scad în ordinea SH-hemoproteine (oxihemoglobina) > tioli simpli (GSH) > SH-proteic (serum albumina). Între grupările SH și ciclul porfirinic al hemului există o puternică competiție pentru combinare cu peroxizii, astfel că în prezența acestor două grupări acțiunea oxidantă a peroxizilor este mult diminuată. Al doilea factor care intervine în oxidarea grupărilor SH de către peroxizi este cel steric. Expunerea grupărilor SH din molecula unei proteine constituie un factor hotărîtor. De aceea denaturarea unei proteine mărește randamentul oxidării prin expunerea mai mare a lanțurilor polipeptidice. Această proprietate a devenit o metodă eficientă pentru cunoașterea structurii secundare și terțiare proteice sau a identificării grupărilor SH în centrii activi ai unor enzime. Astfel de studii au fost efectuate pe papaină [1], gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenază [48], timidilat sintetază [68], lacticodehidrogenază [1] etc. O problemă strîns legată de această proprietate este inactivarea unor enzime sau proteine ce conțin gruparea SH de către radicalii formați în cursul iradierii cu radiații ionizante (Capitolul 4.4). Proteinele ce conțin gruparea SH nu sînt mai radiosensibile. Astfel Armstrong și Buchanan [3] au arătat că deși pierderea activității catalitice a unor enzime iradiate din cauza acțiunii mai ales a radicalului $OH^{\cdot}$ coincide cu oxidarea grupărilor SH, numai o fracțiune mică (aproximativ 4%) din radicali ajung la centrii activi în care se găsește o grupare SH. Multe rezidii aromatice ale aminoacizilor din lanțul polipeptidic sînt hidrofobe și se opun pătrunderii $OH^{\cdot}$. Și în cazul iradierii unor enzime (BH), prezența GSH a oferit o protecție sau o refacere conform reacțiilor:

$$BH + OH^{\cdot} \rightarrow H_2O + B^{\cdot} \qquad (7)$$

$$GSH + B^{\cdot} \rightarrow GS^{\cdot} + BH \qquad (8)$$

Comparînd cinetica inactivării unor proteine ce conțin grupări SH de către radicalii liberi produși prin iradiere cu cea a refacerii, Armstrong și Buchanan [3] au găsit că superoxid dismutaza și catalaza sînt mai eficiente decît tiolii cu masă moleculară mică (GSH, penicilamină, cisteină). Această concluzie se datorește pe de o parte generării de $O_2^{\cdot-}$ în anumite condiții chiar de către grupările SH [4], iar pe de altă parte capacității superoxid dismutazei de a preveni formarea și cumularea formelor active ale O_2 și implicit a peroxizilor.

Scanned with OKEN Scanner

Acțiunea formelor active ale O_2 și ale peroxizilor nu se mărginește doar la oxidarea grupărilor SH și hem, și așa cum s-a arătat în Capitolul 3.1. se va extinde și la alte molecule cum ar fi ciclurile aromatice ale unor amino acizi sau baze pirimidinice, steroizi etc. Atît acțiunea peroxizilor, cît și cea a radiațiilor ionizante produc efecte asemănătoare datorită unei interacțiuni inițiale cu grupările SH (tabelul 10.1)

Tabelul 10.1

Efectul inactivării unor enzime de către peroxizi și radiații [83]

	Peroxizi lipidici	Radiații ionizante
a. Logaritmul fracțiunii enzimatice inactivate este o funcție liniară de		cantitatea de radicali liberi produși
b. Moli de enzimă inactivate per moli de radicali		
alcool dehidrogenază	0,01	0,02
ribonuclează	0,0003	0,1
c. Polimerizare în lanț: $E \xrightarrow{+E} E-E \xrightarrow{+nE} E(E)_nE$		
d. Fluorescență la 450 nm datorită polimerizării și ramificării $2E-NH_2$ + malon dialdehidă→ $E-N=C-C=C-N-E$		
e. Distrugerea oxidativă a unor aminoacizi: metionină, histidină, cistină.		

Pornind de la oxidarea degradativă a grupărilor SH și a unor amino acizi, inactivarea proteinelor se produce prin polimerizare și ramificare, sciziunea lanțurilor polipeptidice (E). Chio și Tappel [12] au arătat că malonic dialdehida este produsul principal responsabil de sciziune. Ca și în cazul polimerilor (Capitolul 6.2) este dificil de a izola agenții oxidativi inițiali sau intermediari din cauza marii lor reactivități. Oricum, o serie de amine, acizi nucleici și fosfolipide dau produși de ramificare cu malonic dialdehida sau alți carbonili printre care și o grupare cromofor fluorescentă avînd o structură de bază Schiff, $R-N=CH-CH=CH-NH-R$. Mai mult, prin păstrarea unor soluții de serum albumină se produc polimerizări și ramificări, izolîndu-se dimeri, trimeri și tetrameri, cît și o fluorescență cu maxim de excitație la 348 nm și de emisie la 425 nm. Aceeași fluorescență se observă și prin păstrarea serului uman și în ambele cazuri ea se datorește peroxizilor lipidici. Adăugarea unor peroxizi lipidici sau a unor produși rezultați din descompunerea peroxizilor (malonic dialdehidă, 2,3-butandionă, aldehidă crotonică) unei soluții proaspete de serum albumină va produce o fluorescență similară celei observate prin păstrarea soluțiilor de albumină sau serului [79].

10.2. MEMBRANE CELULARE ȘI SUBCELULARE

Membranele celulare și subcelulare constituie una din principalele ținte ale radicalilor O_2 sau a peroxizilor deoarece conțin sub formă compactă acizii grași polinesaturați (AGPN), substratul cel mai favorabil peroxidării, cît și catalizatorii prooxidanți cum sînt Fe^{2+} și hemoproteine.

Scanned with OKEN Scanner

În timp ce peroxidarea membranelor biologice este unanim admisă, mecanismele și interpretarea consecințelor sînt foarte controversate. Această situație se datorește în primul rînd compoziției variate calitativ și cantitativ în AGPN din membrane, apoi condițiilor diferite experimentale și în fine cunoștințelor incomplete despre procesele biochimice ce au loc în membrane, a relației lor cu citoplasma. Experimente pe modele de membrane au subliniat producerea unor radicali liberi (printre care și ai O_2) în urma reacției hemoproteinelor cu AGPN [11] sau a NADH-ubichinonei Q cu fosfoetanolamină [12]. Radicalii liberi detectați și prin RES migrează spre partea hidrofobă a membranei. Galpin și Allen [22] lucrînd cu o lipoxigenază au arătat că peroxidarea AGPN depinde foarte mult de raportul AGPN liberi/micelari, de prezența unor alcooli sau acizi carboxilici și în general de modificări minore ale structurii fizico-chimice ale complexelor lipidoproteice micelare.

De îndată ce radicalii liberi au produs o primă moleculă de peroxid lipidic după depășirea sistemelor de protecție, aceasta va induce o reacție de propagare în lanț în AGPN din componența fosfolipidelor aparținînd membranei. Atît inițierea peroxidării AGPN, cît și propagarea prin stratul hidrofob nu sînt cunoscute. În fig. 10.3. sînt prezentate două mecanisme ipotetice privind propagarea peroxidării. După Gardner [23], fig. 10.3. A, peroxizii lipidici de tipul hidroperoxidului acidului linoleic (LAHPO) ar reacționa cu un reziduu N-acetil cisteină din porii membranei datorită acțiunii catalitice a ionilor Fe^{2+}. Tappel [83] propune o schemă mai complexă (fig. 10.3. B), în care peroxidarea se propagă de-a lungul săgeților, gruparea —OOH indicînd un hidroperoxid, reacțiile de ramificare prin săgeți duble, gruparea —OH indică hidroxizii rezultați din descompunerea homolitică a peroxizilor. Propagarea peroxidării este oprită prin acțiunea vitaminei E sau a altui sistem. Raportul molecular AGPN/vitamină E pare să fie 1000 : 1. Schema lui Tappel atribuie un rol însemnat enzimelor din componența membranelor (exemplu ATP-aza), care în urma peroxidării suferă modificări ce induc alterări structurale. Enzimele din componența membranei pot fi modificate și în urma produșilor carbonilici ce rezultă în urma descompunerii peroxizilor. Un prim efect al modificării activității enzimelor din componența membranei este producerea unei rigidități a stratului fosfolipidic, urmată de creșterea permeabilității membranei. Același efect se obține și după mecanismul propus de Gardner (fig. 10.3. A) după care în urma peroxidării se modifică dimensiunile porilor din membrană.

Oricare ar fi mecanismul peroxidării și al propagării, detecția peroxizilor este mai dificilă din motivele arătate în partea întîi (Capitolele 2 și 3), în schimb produșii de descompunere (carbonili, lipide modificate structural etc.) produc o fluorescență cu maxim la 460 nm. Principalul produs are structura asemănătoare unei baze Schiff și se dezvoltă paralel cu intensificarea peroxidării măsurată prin reacția acidului tiobarbituric cu malonic dialdehida rezultată din descompunerea peroxizilor [19]. Pe lîngă baza Schiff fluorescentă mai apar și alți produși fluorescenți ca unele flavine, piridin nucleotide, amino acizi aromatici. Pigmenții fluorescenți ce se acumulează în celule în urma peroxidării *in vivo* sînt cunoscuți de mult timp sub numele de pigmenți ceroidici sau lipofuscină, fiind însă legați de îmbătrînirea celulară din moment ce au fost detectați prin

Scanned with OKEN Scanner

microscopie în fluorescență în organele animalelor [94], microorganismelor [73] bătrîne, în stare de șoc [55] sau în deficit de vitamina E. După cum am amintit mai înainte (Capitolul 10.1) baza Schiff este produsă prin reacția peroxizilor cu grupările amino ale amino acizilor, proteinelor ramificate, acizilor nucleici.

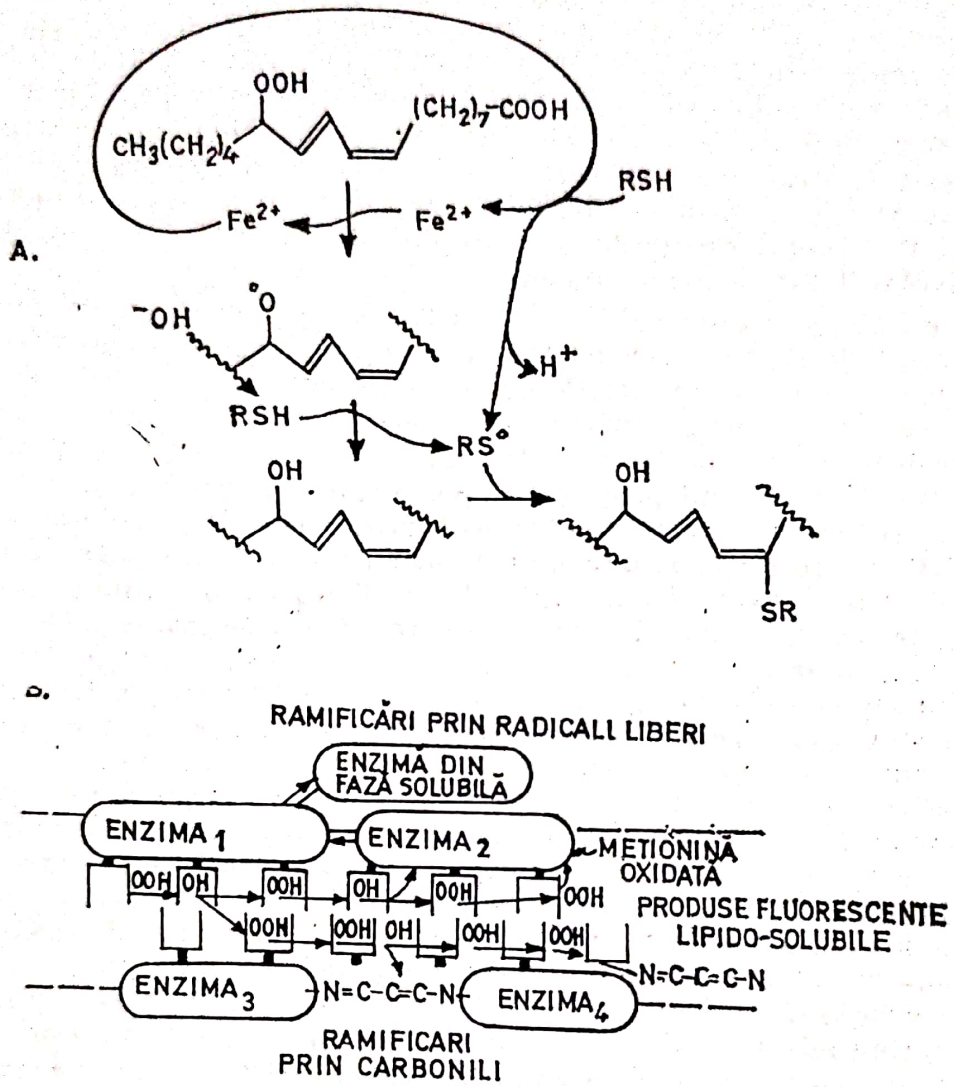


Fig. 10.3. Mecanisme implicate în propagarea peroxidării în membrane. A. Hidroperoxidul acidului linoleic (LHAPO) reacționează cu rezidii N-acetilcisteină (RSH) proteice printr-o reacție catalizată de ioni de fer. B. Secțiune printr-o biomembrană indicînd propagarea peroxidării prin AGPN din componența fosfolipidelor și formarea produselor fluorescente. După Tappel [83].

Membranele hematiilor sînt destul de ușor de preparat sub formă compactă (*ghosts*), conțin o cantitate mare de AGPN, nu sînt contaminate cu membrane subcelulare și produc rapid peroxizi lipidici *in vitro* [62]. Peroxidarea AGPN din membrana eritrocitară precede întotdeauna hemoliza, atît prin oxidarea grupărilor SH din membrane, cît și prin inactivarea acetilcolinesterazei. Deficitul în vitamină E, expunerea *in vitro*

a hematiilor la hiperoxie sau ozon [7], la lumină și hiperoxie [44] produce printre altele formarea unui colesterol hidroperoxid ce crește fragilitatea osmotică prin destabilizarea stratului dublu lipidic în urma unor modificări structurale (asociații Van der Waals inadecvate, creștere disulfuri etc.). Multe anemii hemolitice sau boli asemănătoare se datoresc peroxidării lipidelor și inducerii unei hemolize. Citām în primul rînd β-talasemia [69], protoporfiria eritropoetică [27], deficit congenital în glucozo-6-fosfat dehidrogenază [97], hemoglobinuria paroxistică nocturnă [52], anemia hemolitică a noilor născuți (Capitolul 9).

Datorită condițiilor experimentale mai ușoare, pe membrane de hematii s-a putut evidenția și apariția precoce, înaintea peroxidării, a formelor activate ale O_2, în special a $O_2^{\cdot-}$, rezultat în urma metabolizării unor medicamente de tip fenilhidrazină [26], sau vitamină K_3 [25], reactivității unor hemoglobine patologice [93], autooxidării hemoglobinei sub acțiunea unor difenoli [5].

Mitocondriile pot fi considerate ca generatorii de energie ai celulei și peroxidarea membranelor mitocondriale poate afecta profund integritatea ei. În acest caz peroxidarea poate fi inițiată de Fe^{2+}, acid ascorbic și GSH (Capitolul 8.1.4) mai ales în deficit în vitamina E. După cum s-a arătat anterior, în mitocondrie are loc o producere continuă de $O_2^{\cdot-}$ și de H_2O_2 observîndu-se un paralelism între concentrația la echilibru a radicalilor liberi derivați din O_2 și peroxidarea lipidelor din membranele mitocondrilare. După cum au arătat Nohl și Hegner [57], aproximativ 20 % din $O_2^{\cdot-}$ produs în mitocondrie difuzează scăpînd de sub controlul superoxid dismutazei și poate iniția peroxidarea AGPN. Deoarece malonic dialdehida (un produs de descompunere al peroxizilor) este metabolizată de mitocondrii, determinarea acestui produs ca indiciu al peroxidării este eronată. În acest caz un criteriu mai corect ar fi aprecierea modificărilor produse de peroxizi asupra unor sisteme enzimatice cum sînt citocrom oxidaza și citocromii sau fosforilarea oxidativă ce scad la animalele cu deficit în vitamină E [83]. Un exemplu elocvent de liză mitocondrială produsă în urma peroxidării lipidelor din membrane a fost observat în reticulocite de iepure, în care peroxidarea are loc sub acțiunea unei lipoxigenaze [88]. Acest caz este cu atît mai interesant cu cît lipoxigenazele descoperite pînă în prezent se găseau în plante.

În Capitolul 7.5.1 s-a prezentat posibilitatea peroxidării AGPN din membranele microzomale. Deși majoritatea dovezilor în favoarea peroxidării au fost obținute prin experimente *in vitro*, concluziile obținute întăresc convingerea instalării unei peroxidări a membranelor microzomale în cazuri de intoxicații cu substanțe chimice. Șansele sînt cu atît mai mari cu cît Baird și colaboratorii [6] au arătat că în cazul peroxidării membranelor microzomale, agentul inițial este oxigenul în stare singlet, $^1O_2$, deoarece inhibitorul specific 1,4-diazobiciclo (2, 2, 2) octan poate bloca complet peroxidarea. Pe de altă parte contează mult natura medicamentului din moment ce hexobarbitalul și codeina favorizează peroxidarea, iar aminopirina, zoxazolamina, anilina o inhibă probabil prin caracterul lor antioxidant. Dacă rolul NADPH și al ionilor Fe^{2+} este admis, în schimb natura agentului complexant sau reducător este foarte discutabilă așa încît implicarea metaboliților unor medicamente este neclară.

Scanned with OKEN Scanner

Integritatea structurilor celulare depinde foarte mult de stabilitatea membranelor lizozomale, deoarece eliberarea enzimelor hidrolitice din lizozomi degradează majoritatea macromoleculelor din celulă. Studiile lui Tappel [83] au indicat că lizozomii sînt peroxidaţi cu viteză mult mai încetată decît mitocondriile sau microzomii deoarece conţin mai puţini

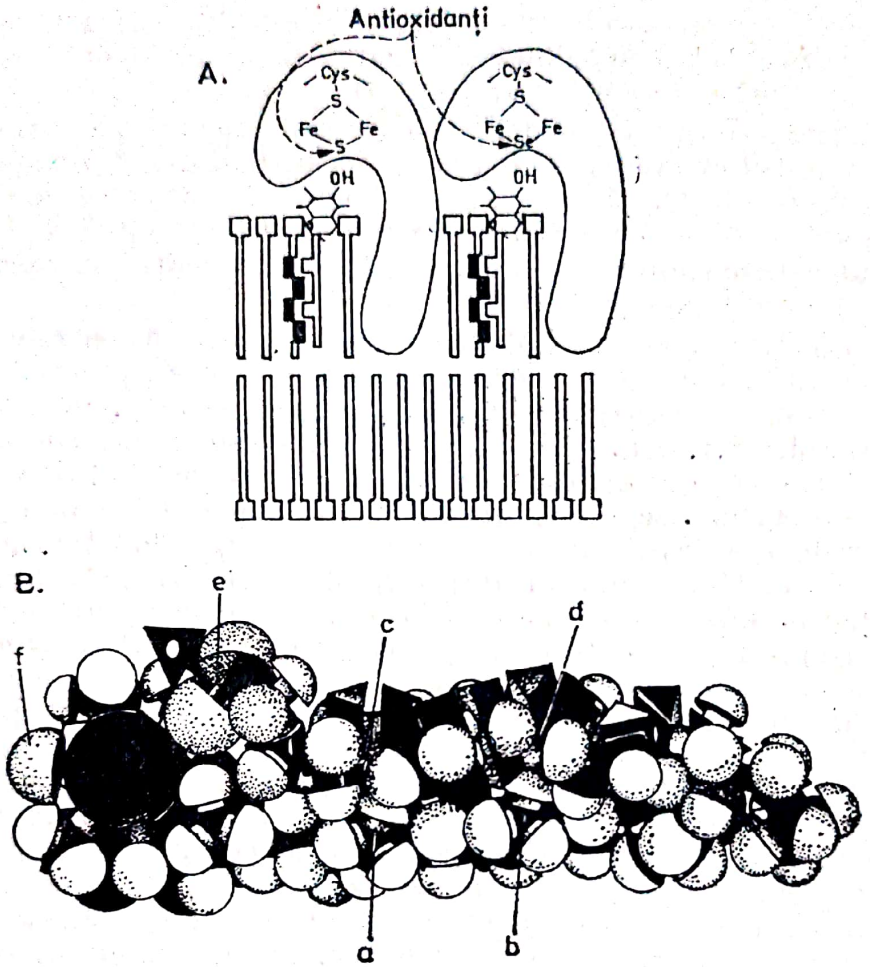


Fig. 10.4. Interacţiuni dintre antioxidanţii din membranele biologice. A. Interacţiunea proteinelor ce conţin S şi Se cu vitamina E din stratul dublu fosfolipidic; partea înnegrită reprezintă peroxizi lipidici proveniţi din AGPN. B. Model tridimensional al interacţiunii fosfolipid arachidonil (dublele legături în c şi d) cu vitamina E (grupările metil în a şi b). Partea glicerol (e) a fosfolipidelor şi gruparea OH (f) a vitaminei E aparţin aceluiaşi complex. După Diplock [18].

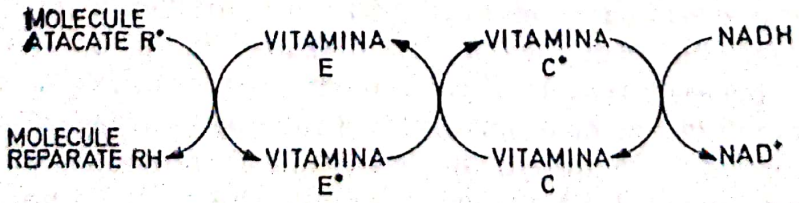


Fig. 10.5. Reacţia neenzimatică dintre vitaminele C şi E în cursul procesului reparării unor molecule din compoziţia membranelor. După Pasker [66]

AGPN, dar și mai puțini prooxidanți de tip citocromi. Cu toate acestea s-au obținut grade suficiente de peroxidare pentru a produce eliberarea enzimelor hidrolitice prin amestec de Fe^{3+} și un agent reducător (cisteină, GSH, ascorbat) sau prin fotoperoxidarea colesterolului din membrana lizozomală [81], specia reactivă fiind $^1O_2$.

Ținînd seama de prezența în cantitate relativ mare a AGPN în membrane, și de a unor factori prooxidanți (hemoproteine, Fe^{2+}) ar trebui ca producerea peroxidării să fie mai frecventă, chiar și *in vitro*. Sistemele protectoare din membrană par să fie prezente prin GSH peroxidază [50], deoarece acțiunea superoxid dismutazei în acest caz este discutabilă [65]. În schimb prezența seleniului și a vitaminei E în structura membranelor pare să fie esențială pentru protecție și stabilitatea fizico-chimică. Studii despre interacțiunea antioxidant-acid gras nu au dat imagini sugestive. Pentru ilustrare prezentăm atît o diagramă ipotetică a acestei interacțiuni (fig. 10.4.A), cît și într-un model tridimensional (fig. 10.4. B). Prin modelul prezentat, Diplock și Lucy [18] au căutat să sublinieze rolul structural al vitaminei E și Se, în special între catena fitil a vitaminei E și lanțurile acil ale AGPN sau între grupările metil din catena vitaminei și dublele legături în *cis* ale AGPN. Aceste interacțiuni au loc tridimensional, creînd o rețea suprapusă stratului dublu lipido-proteic. În acest sens Kaschnitz și Hatefi [41] au arătat că adăugarea unor agenți chaotropici (detergenți, halogenuri) care dezorganizează microstructura membranei ușurează peroxidarea. Legat de acestea, Thomson și Reitz [86] au arătat că efectul prooxidant al NADPH se datorește complexării Fe^{2+} de către ATP (ADP) care astfel printr-un efect cooperativ ușurează legarea NADPH de către membrane. Agenții chaotropici sau generatorii de forme activate ale O_2 dezorganizează microstructura membranelor și măresc expunerea AGPN din componența fosfolipidelor stratului lipidic. Recent Pasker și colaboratorii [66] au descoperit o reacție neenzimatică de regenerare a vitaminei E din componența membranelor cu ajutorul vitaminei C. După cum se observă în fig. 10.5, vitamina E ar stopa desfășurarea peroxidării, vitamina C ar regenera vitamina E, iar acidul ascorbic ar fi redus de către NADH. Autorii au găsit că reacția propriu-zisă de regenerare a vitaminei E de către acidul ascorbic decurge rapid cu o constantă de viteză de $1{,}55 \cdot 10^6\ M^{-1}s^{-1}$. Combinația sinergică între doi antioxidanți, unul lipofil (vitamina E) și altul hidrosolubil (vitamina C) asigură o protecție eficientă a membranelor.

10.3. STĂRI PATOLOGICE ASOCIATE MODIFICĂRILOR MEMBRANELOR

După cum am mai amintit, modificările cantitative ale unor parametri biochimici (vitamina E, Se, malonic dialdehida) descrise în unele lucrări nu înseamnă neapărat că sînt și cauza stărilor patologice în care au fost observate. De aceea, la stadiul actual al cunoștințelor, asemenea lucrări coexistă pe lîngă alte modificări clinice, hematologice, biologice etc.

Scanned with OKEN Scanner

10.3.1. HIPEROXIE

Se știe că expunerea organismelor la o atmosferă 100 % O_2 este letală datorită probabil producerii de radicali liberi și inactivării unor procese metabolice. Unul din acești radicali pare să fie $O_2^{\cdot-}$ din moment ce expunerea unor bacterii, alge [65] la presiuni hiperbarice de O_2 induce un nivel crescut al superoxid dismutazei, fapt observat și la șobolani [15].

Folosirea unei atmosfere bogate în O_2 în aviație, scufundări în adîncime, astronautică, practica medicală (chirurgie, astm, apoplexie) din ce în ce mai mult ridică acut problema toxicității oxigenului. Încercări de protecție experimentală față de O_2 hiperbaric prin administrare în aerosoli a superoxid dismutazei nu au fost încurajatoare [70], probabil prin imposibilitatea trecerii enzimei prin membrane sau bariera sînge-creier. Șobolanii la care s-a provocat o carență în vitamina E sînt cei mai susceptibili la toxicitatea O_2 sugerînd posibila implicare a peroxidării AGPN din membrane. Această constatare este sprijinită de scăderea, în aceste condiții a GSH din hematii, ficat și plămîni, a GSH reductazei și a NADPH [9, 76] parametrii implicați în activitatea GSH peroxidazei (Capitolul 9.4.). În plus în aceste condiții se produc modificări structurale ale hematiilor ce duc la hemoliză [98]. Nishiki și colaboratorii [56] folosind o serie de metode originale și complexe (măsurarea GSH eliberat, a formării peroxizilor și produșilor de degradare) *in vivo* în condiții de O_2 hiperbaric au dovedit convingător peroxidarea AGPN din membrane și rolul protector al GSH peroxidazei împreună cu vitamina E. Tot ei au arătat că susținerea unui nivel ridicat în ATP este necesară, cum s-a dovedit ulterior prin administrare de succinat (1 mg/kg) ce induce o creștere a ATP prin ciclul Krebs [56]. York și colaboratorii [96] au arătat că același sistem defensiv este implicat și în protejarea plămînilor de ozon, poluanți atmosferici și fum de țigară. Fumul de țigară conține agenți oxidanți ca oxizi de azot și peroxizi (pe lîngă unele hidrocarburi) care produc peroxidarea membranelor macrofagelor alveolare. Creșterea activității GSH peroxidazei din plămînii fumătorilor indică un fenomen adaptativ.

Sistemele defensive contra peroxidării din plămîni (superoxid dismutaza și GSH peroxidaza) se dezvoltă în primele săptămîni de la naștere.

Lee [45] atrage atenția asupra unor accidente fatale la noii născuți, în special imaturi, ce ar putea fi explicate prin nivelul scăzut al sistemelor biochimice defensive. Aceasta produce leziunea cunoscută prin numele de boală a membranei hialine observată la unii noi născuți.

10.3.2. BĂTRÎNEȚEA

Cu ocazia discutării formării peroxizilor în mitocondrii (Capitolul 8.1.4) s-a arătat că formarea $O_2^{\cdot-}$, ca urmare a activității normale metabolice, crește cu vîrsta animalelor de experiență. Pe de altă parte, se pare că superoxid dismutaza și celelalte sisteme protectoare își micșorează activitatea la bătrînețe, producînd creșterea peroxidării AGPN din membrane [40, 96]. Această suită de procese este inevitabilă din moment ce se produce pe toată scara organismelor aerobe. Munkres [55] a arătat că la *Neurospora crassa* îmbătrînirea produce peroxidarea lipidelor din mem-

Scanned with OKEN Scanner

brană și acumularea lipofuscinei, procese inhibate de antioxidanți ca acidul nordihidroguaiaretic. Se confirmă astfel încă o dată prelungirea vieții bacteriilor în urma adăugării în mediul de cultură a unor antioxidanți [55]. Tot Munkres [54] studiind îmbătrînirea unor microorganisme a găsit că adăugarea unor aminoacizi analogi (4-fluorofenilalanină, L-ethionină) în mediul nutritiv scurtează viața și induce erori în biosinteza proteinelor din membrane facilitînd peroxidarea lor. Peroxizii și produșii lor de descompunere (malonic dialdehidă) reacționează cu acidul dezoxiribonucleic modificînd transmiterea informației genetice normale permanentizînd biosinteza unor membrane defectuoase structural.

La mamifere, creșterea peroxidării lipidelor din membrane odată cu vîrsta a fost confirmată [32] furnizînd astfel baza ipotezei creșterii radicalilor liberi ca etiologie a senescenței [33]. După cum am arătat anterior (Capitolul 10.2) creșterea peroxidării AGPN din membrane produce formarea în unele organe a pigmentului lipofuscină rezultat din descompunerea peroxizilor lipidici. Acumularea lipofuscinei sau substanțelor ceroide a fost observată încă din 1894 de către Hodge în citoplasma neuronilor pacienților senili. Lipofuscina de fapt este o acumulare de baze Schiff rezultate din descompunerea peroxizilor, lipide, proteine, rezidii mitocondriale formate în vezicule autofagosomale, și care persistă în celule în cantități variabile. Cantitatea de lipofuscină crește cu vîrsta și cu unele stări patologice grave cum sint idioția familiară, gangliosidoză Tay-Sachs, sindromul organic cronic (o îmbătrînire precoce).

Producerea lipofuscinei în condiții experimentale a confirmat sensibilizarea membranelor odată cu creșterea vîrstei (fig. 10.6. A). Tappel [83] a ajuns chiar să calculeze că în 50 ani un om acumulează 14,3 mg lipofuscină/gram miocard, că 1 mg lipofuscină conține 0,11 nmoli baze Schiff și că formarea pigmentului începe odată cu depășirea absorbției de 0,6 μmoli radicali liberi per gram țesut. Tot Tappel [83] a confirmat impor-

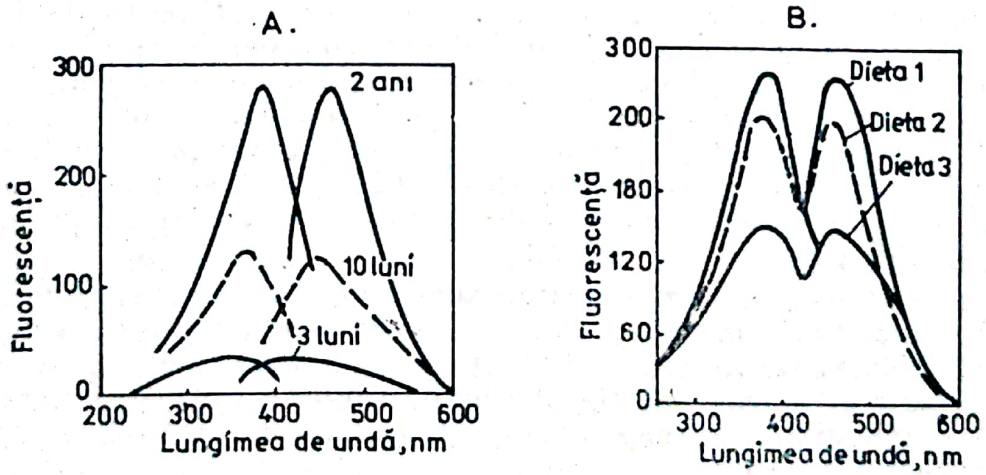


Fig. 10.6. Spectrele de fluorescență a compușilor rezultați din descompunerea peroxizilor lipidici. A. Formarea produselor fluorescente (din testicol) în funcție de vîrsta șoarecilor din experiment. B. Șoarecii au fost supuși timp de 14 luni la diferite diete (adăugate la aceeași hrană standard : (1) 33 mg vitamină E/kg, (2) 1,25 mg vitamină E, 1,5 g metionină, 44 mg/BHT/kg, (3) 2,7 g vitamină E, 1 g ascorbat 3 g metionină, 2 g BHT și 0,11 mg selenit de sodiu/kg. După sacrificare s-a determinat în extracte de testicol spectrul de fluorescență. După Tappel [83]

tanța calității hranei pentru dezvoltarea îmbătrînirii (fig. 10.6. B), fapt observat și de Munkres pe bacterii [54]. Prezența unor antioxidanți ca vitamina E, selenit scade considerabil acumularea lipofuscinei. Efectul pozitiv al metioninei confirmă lucrările lui Oeriu [58] asupra importanței unui aport adecvat în grupări sulfhidril în întîrzierea îmbătrînirii. Între 20—40 ani grupările SH din ser reprezintă aproximativ 55 μmoli% scăzînd la 40 μmoli la 80 ani [33]. Un alt argument în favoarea peroxidării ca factor agravant în senescență este accelerarea îmbătrînirii în urma expunerii la acțiunea radiațiilor ionizante, care de asemenea favorizează peroxidarea membranelor [76].

10.3.3. HEPATOTOXICITATE

Cu ocazia discutării peroxidării ce poate apărea în cursul metabolizării medicamentelor și altor compuși străini organismului (Capitolul 7.5.1.) s-a arătat mecanismul probabil de peroxidare a lipidelor microzomale. Acesta implică o sursă de $O_2^{\cdot-}$ și prezența unor factori favorizanți componenți ai lanțului transportor de electroni: NADPH, citocrom P-450 etc.

Administrarea acută sau cronică de tetraclorură de carbon (CCl_4) a constituit modelul clasic al producerii infiltrării grase și instalarea unei hepatotoxicități. Unele controverse asupra mecanismului biochimic se datoresc unor diferențe în condiții experimentale care influențează marea capacitate reparatorie a ficatului. Această capacitate produce și o mare variație individuală, fapt constatat și clinic. În al doilea rînd, instalarea unei hepatotoxicități experimentale se va însoți de multiple modificări biochimice (scăderea activităților glucozo-6-fosfatazei și etilmorfin demetilazei) și morfologice ce vor fi influențate de factori individuali sau de condițiile experimentale. În al treilea rînd, regimul alimentar (prezența antioxidanților) [84], factori stresanți nespecifici cum ar fi particule de cărbune [71] sau medicamente [17] pot influența considerabil rezultatele biochimice sau instalarea hepatotoxicității. În plus, nu este sigur dacă și alte substanțe, cum ar fi alcoolul etilic produce o hepatotoxicitate după același mecanism ca CCl_4. Cu excepția infiltrării grase produse de ethionină, administrarea acută sau cronică de CCl_4, etanol, acid orotic, fosfor, paraquat etc. este mult influențată de prezența unor antioxidanți (fenilendiamină, Se, vitamină E) [17, 84].

Acest fapt experimental unanim admis sugerează formarea unor radicali liberi rezultați în urma metabolizării substanțelor administrate de către sistemul hidroxilant microzomal, din moment ce și alte substanțe ce sînt metabolizate pe aceeași cale (fenobarbital, cloramfenicol) pot stimula sau inhiba dezvoltarea unei hepatotoxicități și formarea peroxizilor [20].

Formarea peroxizilor lipidici în urma administrării substanțelor citate este sigură, fiind observată de mulți cercetători, folosind atît absorbția conjugării dien [17], formarea malonic dialdehidei [37] sau creșterea în aerul expirat a etanului, rezultat din descompunerea peroxizilor [46]. Odată peroxidarea lipidelor microzomale începută, va declanșa în cazul depășirii sistemelor protectoare, modificări morfologice indicate în fig. 10.7, ce duc în final la infiltrare grasă, fibroză, ciroză.

Scanned with OKEN Scanner

Experimentele efectuate pe hepatocite izolate de la animale [90] au arătat că în stare de inaniţie se produce o peroxidare a AGPN însoţită de formarea pigmenţilor ceroizi (lipofuscină). Intoxicarea cu CCl_4 amplifică această peroxidare, sugerînd existenţa unui răspuns comun în faţa unei

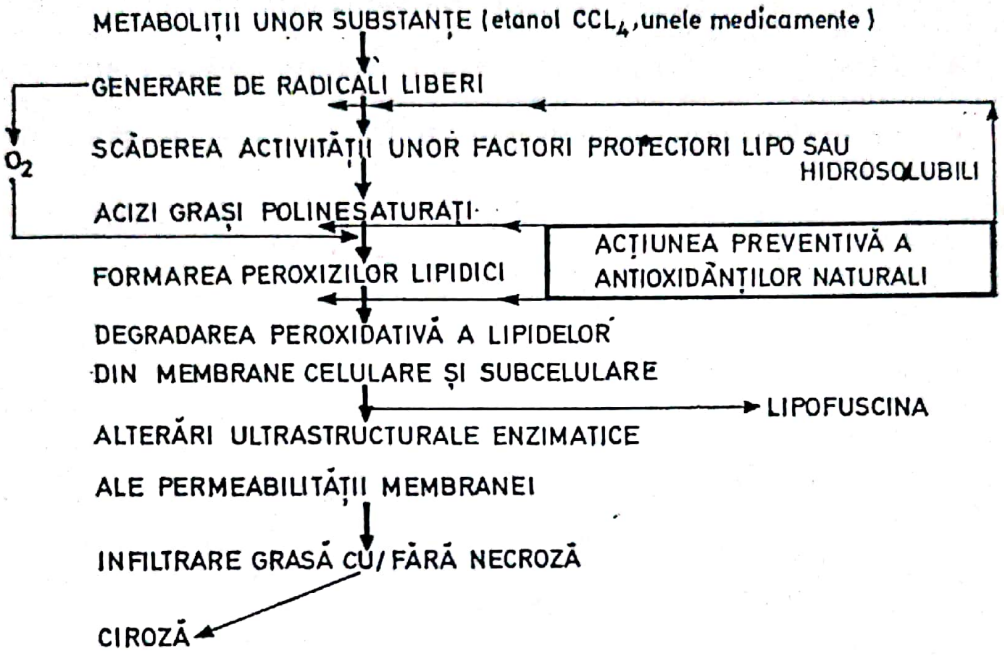


Fig. 10.7. Mecanismul ipotetic al producerii cirozei de către agenţi chimici hepatotoxici şi locul acţiunii antioxidanţilor.

agresiuni. Peroxidarea lipidelor, cel puţin în ficat, ar fi un fenomen fiziologic controlat de sistemele protectoare, care în anumite limite nu duce la pierdere de AGPN. Pe baza acestei concluzii, peroxidarea lipidelor în ficat ar fi un răspuns nespecific la o agresiune chimică, explicînd astfel apariţia peroxizilor lipidici şi a produşilor de descompunere (malonic dialdehidă, etan) în urma intoxicării cu substanţe cu caracter lipofil ce sînt metabolizate prin sistemul hidroxilant microzomal dependent de NADPH. Astfel, peroxizii lipidici şi produşii lor de descompunere au fost detectaţi în urma intoxicării cu CCl_4 [84], etanol [87], ierbicidul paraquat [63], bromtriclorometan [42], baygon [80]. O dovadă suplimentară a participării peroxidării la instalarea unei hepatotoxicităţi este efectul protector observat în urma administrării de GSH, dietilditiocarbamat, cistamină [75], compuşi ce eliberează grupări SH libere şi cu acţiune antioxidantă. Dealtfel, scăderea grupărilor SH în urma administrării unor substanţe hepatotoxice constituie unul din efectele precoce biochimice [2].

Un exemplu interesant de peroxidare a lipidelor din membrane îl constituie intoxicaţia cu DDT (*p-p'*-diclor-difenil-tricloretan) şi alte insecticide clorurate înrudite. La un nivel mic de absorbţie, DDT produce o stimulare a enzimelor metabolizante din microzomi, dar la o concentraţie mai mare se instalează o intoxicaţie de tipul observat în cazul CCl_4 [83]. Peştii şi păsările marine au un conţinut mare în AGPN şi mic în vitamină E şi Se din care cauză sînt susceptibile la intoxicaţia cu DDT.

Scanned with OKEN Scanner

10.3.4. ANEMII HEMOLITICE

La stadiul actual al cunoștințelor se pare că doar în cazul hematiei se poate afirma implicarea peroxidării lipidelor din membrană ca etapă în cursul declanșării hemolizei. Membranele leucocitelor, în special a limfocitelor prezintă o rezistență marcată la agenți oxidanți probabil datorită calității acizilor grași din componența fosfolipidelor.

În fig. 10.8 este prezentată o schemă a hemolizei, în care sînt cuprinse principalele etape din proces, produsă fie prin îmbătrînire, fie în urma acțiunii unor medicamente generatoare de O_2^- și H_2O_2. Se pare [49, 82]

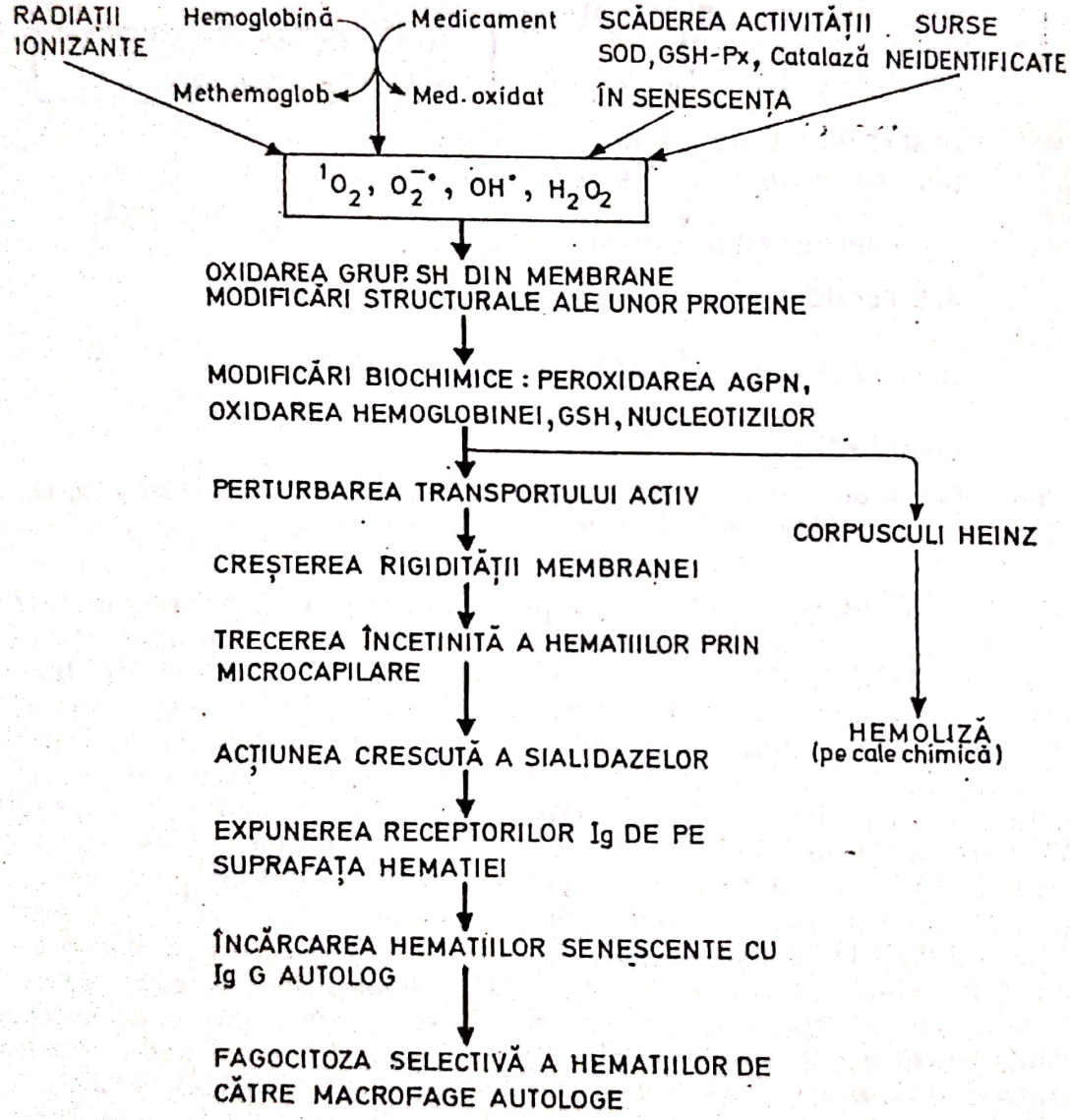


Fig. 10.8. Mecanismele producerii hemolizei și distrugerii fiziologice a hematiilor. Modificat după Mărgineanu [49] și Goldberg [26].

că atît fiziologic (îmbătrînire), cît și patologic (radiații sau medicamente) prima etapă o constituie modificarea transportului activ care determină schimbări în activitatea enzimelor glicolitice și a raporturilor ATP/ADP,

Scanned with OKEN Scanner

GSH/GSSG, NAHD/NAD. Aceste modificări care sensibilizează membrana hematiei permite formarea unor radicali liberi și a peroxizilor datorită afectării sistemelor protectoare descrise în fig. 9.9.

Lăsînd la o parte etapele ulterioare peroxidării lipidelor din membrana eritrocitară, care se pare că sînt ireversibile [26], observăm din fig. 10.8 că primele etape sînt reversibile și condiționate reciproc. Depășirea sistemelor protectoare (fig. 9.9) permite instalarea peroxidării ireversibile. Această schemă explică rezerva funcțională a hematiei care în cele 120 zile poate face față multor agresiuni oxidante, dintre care cele mai cunoscute sînt datorate interacțiunii cu O_2 și cu metaboliții unor medicamente ce generează O_2^-. Se pare că O_2^- constituie o sursă permanentă oxidantă pentru hematie din moment ce rezultă din interacțiunea O_2 cu hemoglobina [53, 62] sau a hemoglobinei cu unele medicamente ca fenilhidrazina, vitamina K_3 [37] ori substanțe ca difenoli, chinone, arilhidroxilamine [5]. În plus, suspensii din microzomii peroxidați au un efect hemolitic puternic [91] acționînd prin intermediul unui compus extractabil în solvenți organici. Acest experiment sugerează o posibilă acțiune de la distanță în cazul unei hepatotoxicități, explicînd asocierea unei anemii ca efect secundar. Desigur, deficite congenitale în unii din factorii protectori (vitamină E, Se, GSH) vor favoriza producerea peroxidării și a hemolizei în astfel de cazuri, un efect similar fiind observat în deficit congenital în glucozo-6-fosfat dehidrogenază [39, 43, 97].

Interacțiunea O_2 cu hemoglobina și producerea de O_2^- a fost incriminată în porfirii (cutanea, tarda, variegata, protoporfirie) în care s-au găsit cantități crescute de peroxizi [93], și la care administrarea de antioxidanți (vitamina E, caroteni) are un efect terapeutic [72].

Într-o serie de stări patologice în care s-au observat anemii greu de explicat s-au găsit cantități crescute de peroxizi sau produși de descompunere. Menționăm în acest sens în primul rînd anemiile hemolitice ale noilor născuți [43], hemoglobinuria paroxistică nocturnă [8], trisomia 21 (sindromul Down) [77], β-thalasemie [30]. Această ultimă boală prezintă o anomalitate în componența lipidelor din membrana eritrocitară, în special o cantitate crescută de AGPN ce produce o sensibilitate crescută la agenți oxidanți (inclusiv radiații UV) și o peroxidare *in vivo*. Așa se explică și efectul terapeutic al acidului 2,3-dihidroxibenzoic, un cunoscut captator de radicali liberi și complexant al Fe^{2+} [30, 46].

În toate cazurile, congenitale sau dobîndite, în care s-au observat hemoliză asociată cu peroxidarea AGPN din membrane s-a notat o scădere a GSH sau o modificare în sistemul GSH peroxidază [43, 95].

10.4. ATEROSCLEROZA ȘI DIABETUL

Implicarea peroxidării lipidelor din membrane în aceste două boli din ce în ce mai frecvente reprezintă ipoteza cea mai îndrăzneață, bazată însă pe suficiente date experimentale pentru a fi luată în considerație.

Ateroscleroza este o boală caracterizată prin îngroșarea locală a peretelui interior al arterelor. În general aceste îngroșări sînt de trei tipuri: straturi grase formate prin acumularea celulelor de mușchi netezi cu cantități variabile de lipide (observabile la copii), plăci fibroase constînd

Scanned with OKEN Scanner

din aglomerarea de celule întregi și rezidii cu lipide, colagen și fibre elastice (observabile la adolescenți) și în fine ateroame rezultate din plăci alterate de necroză, calcifiere, tromboză sau hemoragie. Majoritatea cercetătorilor admit [74] drept cauză inițială, locală, existența unui traumatism minor asupra peretelui intim al unui vas sanguin ce duce la detașarea unor celule și aderarea trombocitelor, declanșînd suita de reacții descrise în Capitolul 7.5.3 (datorită implicării peroxizilor) și care opresc hemoragia (de mică amploare) formînd un trombus. Astfel de accidente se produc se pare destul de frecvent la toți oamenii din moment ce tipurile de îngroșări menționate sînt prezente încă din copilărie.

Implicarea peroxizilor intervine din momentul fenomenului de aderare al trombocitelor și al accelerării biosintezei prostaglandinelor (Capitolul 7.5. 2) și n-ar fi exclus depășirea, în unele cazuri, a sistemelor de reglare. După Wilson [92], care a sistematizat posibilele implicații ale peroxidării în ateroscleroză, autooxidarea lipidelor începe și la alte nivele, nu numai local, datorită modificării raporturilor oxidanți/antioxidanți. După cum se prezintă în fig. 10.9, lipide peroxidate formate în alte țesuturi pot fi antrenate în circuitul sanguin și oprite într-un vas unde s-a produs un trombus mărind astfel stratul sau placa fibroasă deja formată. Argumentul

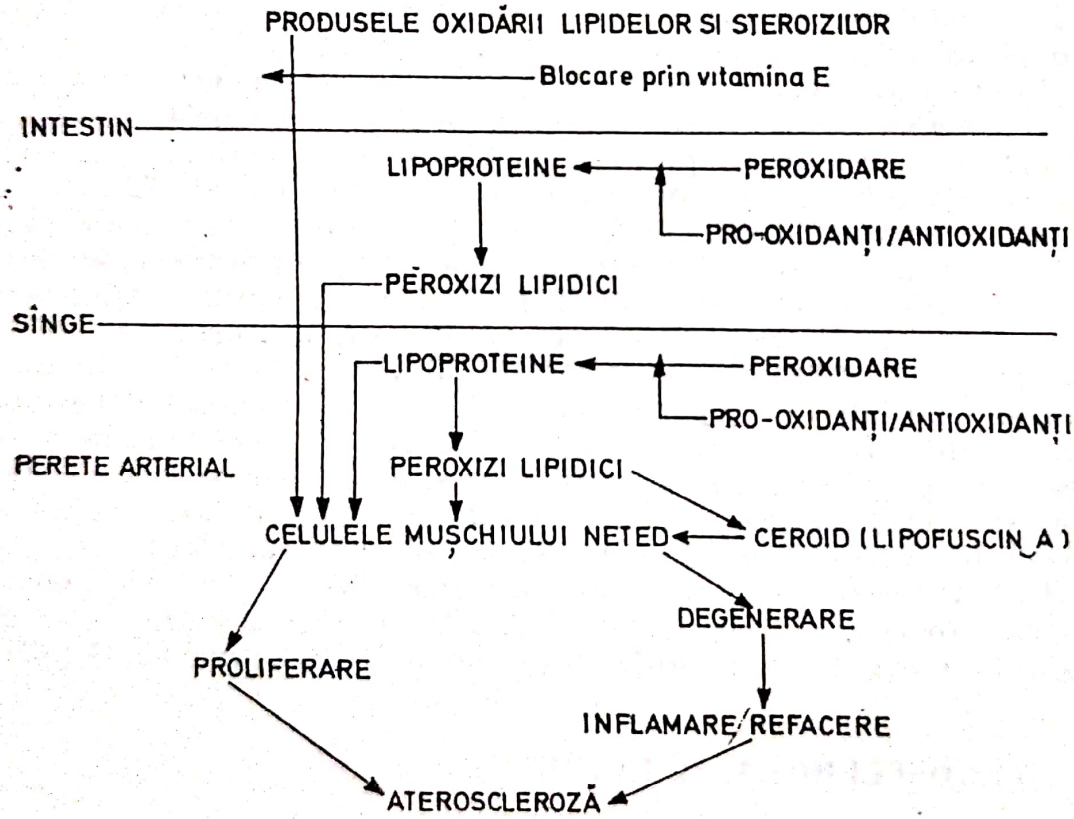


Fig. 10.9. Mecanismul ipotetic al acțiunii peroxizilor lipidici în ateroscleroză. Peroxizii pot apărea în alimente, intestin, sînge sau perete arterial alterînd metabolismul celular al mușchiului neted din artere. După Wilson [92]

principal nu constă în relatările sporadice despre creșterea peroxizilor lipidici în sînge la ateromatoși [24], în ateroame [89], care pot fi discutabile, dar acumulările de pigmenți ceroizi observate de mai mulți autori [67]

Scanned with OKEN Scanner

în ateroame și care sînt confirmabile. Așa cum am mai arătat în acest capitol pigmenții ceroizi sînt rezultatul descompunerii peroxizilor lipidici. Acești pigmenți apar în stadii avansate ale bolii.

Un alt argument al implicării peroxidării în etiologia aterosclerozei îl constituie dovezile despre peroxidarea colesterolului. Astfel în ateroame au fost găsite nu numai cantități crescute de colesterol, dar și de acizi colesteril hidroxioctadecadienoici formați prin reducerea grupării peroxid a colesterolului-linoleat peroxidat [14], iar produșii autooxidării colesterolului 25-hidroxicolesterol și colestan-3 β, 5α, 6β-triol sînt citotoxici pentru celulele mușchiului neted aortic [92]. Concentrația scăzută de GSH peroxidază din pereții vaselor sanguine creează condiții favorabile acțiunii H_2O_2 și a altor radicali asupra AGPN sau lipidelor ori lipoproteinelor [89]. Deși tratamentul aterosclerozei cu antioxidanți ca vitamina E ori sintetici nu a dat rezultate concludente, în schimb aceștia previn dezvoltarea aterosclerozei în cazul unui deficit în colină, condiție agravantă a acestei boli [16].

Cutler și Schneider [17] au obținut experimental fibroza miocardului în urma administrării cronice a unei cantități totalizînd 353 mg linoleat hidroperoxid la șobolan. La iepure, fibroza miocardului și leziuni aortice au fost obținute după administrarea fracționată a 800 mg. Administrarea în aceleași condiții de linoleat, produși de degradarea a hidroperoxidului sau colesterol nu au produs fibroza sau ateroame.

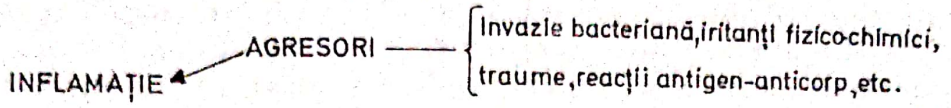
Se admite existența unei legături reciproce favorizante între ateroscleroză și diabet, probabil legată de insuficienta oxidare a acizilor grași. Implicarea peroxizilor lipidici în diabet este de dată recentă și se datorește prezenței lor crescute în plasma pacienților în stadiu avansat [74]. Pe de altă parte, în diabetul experimental produs de aloxan se produc radicali liberi ca $OH^{\cdot}$, iar SOD, catalaza și captatori ai $OH^{\cdot}$ neutralizează acțiunea toxică a aloxanului [29]. Olinescu și colaboratorii [61] au arătat că în cursul acțiunii toxice a aloxanului se produce o oxidare a grupărilor SH libere. La doze mici, din contra, se pun în libertate grupări SH libere, crește activitatea GSH peroxidazei. Intensificarea activității GSH-insulin transhidrogenazei din ficat în diabetul aloxanic poate contribui la inactivarea crescută a sistemelor enzimatice de protecție bazate pe GSH și la favorizarea unor leziuni prin peroxizi.

10.5. INFLAMAȚII

Inflamațiile reprezintă un proces complex, dinamic, ce poate fi definit ca o reacție a țesuturilor la o agresiune. Complexitatea fenomenului este ilustrată în fig. 10.10, în care se încearcă să se prezinte multitudinea reacțiilor citologice, hematologice și biochimice, din care numai o parte sînt cunoscute sau unanim admise. Scopul final al acestui proces este distrugerea cauzei agresiunii și a consecințelor ei prin mobilizarea unor sisteme multiple, variate ca natură, specializare, mod de acțiune etc. În cazul neutralizării agresiunii și reparării, rezultatul final se va concretiza într-un granulom inflamator (cicatrice) ce va evolua spre absorbție sau inflamație cronică [78].

Scanned with OKEN Scanner

Datorită complexităţii procesului inflamator, implicarea peroxizilor se produce la mai multe nivele, şi pentru claritate va fi prezentată separat, deşi în realitate reacţiile generatoare de peroxizi se întrepătrund. Implicarea peroxizilor este justificată de profundele modificări ale mem-



Faza a I-a, leziuni tisulare locale, denaturarea unor proteine şi membrane, încetinirea circulaţiei venoase, invadare locală cu macrofage, acidoză, catabolism crescut al glicogenului.

Faza a II-a, catabolică, caracterizată în special printr-o proteoliză şi eliberarea de mediatori (histamină) ce cresc permeabilitatea capilară. Eliberare de kinine datorită lizei lizozomilor şi stimulării acţiunii tripsinei şi kalikreinei. Biosinteză crescută a prostaglandinelor. Acumulare mărită de macrofage, limfocite şi fibroblaste. Agregare de trombocite.

Faza a III-a, reacţională, caracterizată prin hipertermie şi creşterea permeabilităţii membranelor, vasodilatare. Se produce oedem şi scade presiunea osmotică. Cresc fibrinogenul, globuline, glicoproteine serice şi scad albumina şi sideremia.

Faza a IV-a, anabolică, caracterizată prin creşterea biosintezelor de proteine, nucleotide ATP. Are loc o neoformare de ţesut conjunctiv, vase sanguine şi colagen; se acumulează fibroblaste.

Faza a V-a, formarea unui granulom compus dintr-o zonă de necroză centrală înconjurată de fibroblaste, iar în exterior de un conglomerat limfo-plasmocitar diseminat în ţesut fibros.

Fig. 10.10. Principalele faze ale procesului inflamator

branelor celulare, necroze, eliberarea unor substraturi (AGPN) şi factori prooxidanţi (hemoproteine). În primul rînd administrarea acidului arachidonic, unul din cei mai răspîndiţi AGPN, pe cale parenterală intensifică biosinteza prostaglandinelor şi a unor endoperoxizi (Capitolul 7.5.2), agragarea trombocitelor (Capitolul 7.5.3), hipertermia şi are un efect vasodilatator prin eliberarea unui factor contractant [21]. Dacă admitem că peroxidarea AGPN din membrane este o reacţie asociată modificărilor membranelor celulare din inflamaţie, atunci administrarea acidului arachidonic amplifică procesul inflamator, iar medicamentele anti-inflamatoare nesteroide (indometacin) inhibă acţiunea acestui acid [21]. Din păcate, datorită complexităţii procesului inflamator, efectul administrării acidului arachidonic nu este atît de clar, în primul rînd datorită acţiunii contradictorii a prostaglandinelor, endoperoxizilor şi prostaciclinelor de a favoriza sau de a inhiba reacţiile componente ale inflamaţiei. După cum a arătat recent Bragt [10], această neclaritate nu a putut fi rezolvată nici prin studiul *in vitro* a eliberării prostaglandinelor din mastocite în urma stimulării cu acid arachidonic. În fig. 10.11 este prezentat schematic rolul prezumtiv al acidului arachidonic în inflamaţii şi interacţiunea cu unii agenţi anti-inflamatori. Deşi catalaza nu intervine în descompunerea peroxizilor lipidici, efectul ei inhibitor asupra agregării trombocitelor, contracţiei unor vase produse de acidul arachidonic [95], activitatea invers proporţională cu proteina C reactivă sugerează un rol acestei enzime [35].

Fig. 10.11 indică de asemenea rolul inhibitor al unor compuşi tiolici (mercaptoetanol, dietilditiocarbamat) asupra unor reacţii componente a inflamaţiei (agregarea trombocitelor). Menţionăm că, în general, în cazuri avansate de reumatism grupările SH plasmatice sînt scăzute [34].

Scanned with OKEN Scanner

Cele mai abundente lucrări privitor la peroxidarea în inflamaţii se axează pe detectarea radicalilor liberi în inflamaţii, în special $O_2^{\cdot-}$ provenit din activarea macrofagilor şi fagocitozei [28], observabil atît prin chemiluminiscenţă [40], cît şi prin determinarea activităţii superoxid dismutazei în lichidul sinovial [51], pe care îl protejează. $O_2^{\cdot-}$ este eliberat mai ales prin contactul de suprafaţă al macrofagelor cu diverşi agenţi ca bacterii, imunoglobuline IgG agregate etc. SOD şi catalaza previn depolimerizarea lichidului sinovial de către $OH^{\cdot}$, iar SOD injectată ameliorează inflamaţiile şi în fine leucocitele pacienţilor reumatici în tratament au activitate SOD scăzută [51]. *In vitro*, producerea $O_2^{\cdot-}$ de către macrofage peritoneale este inhibată de medicamente anti-inflamatoare de tip indometacin, fenilbutazonă, aspirină, ibuprofen [64]. Mai mult, injectarea la şobolan a sistemului xantină-xantin oxidază, generator de $O_2^{\cdot-}$ şi promotor al peroxidării produce oedem şi eliberarea histaminei din mastocite [59]; medicamente anti-inflamatoare inhibă acest efect. În fine, menţio-

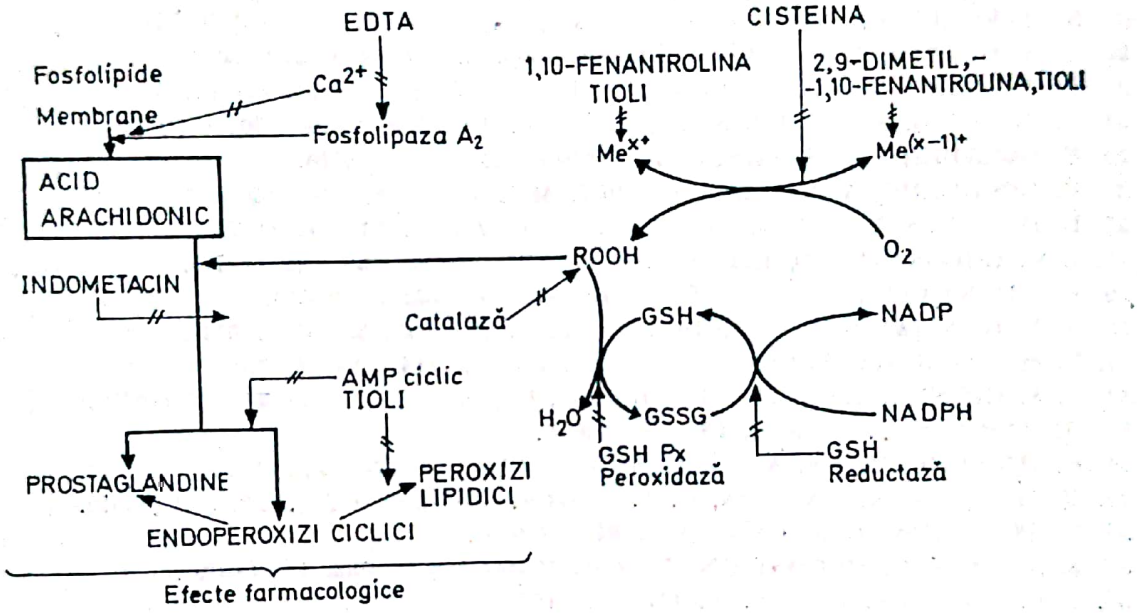


Fig. 10.11. Schema ipotetică a interacţiunilor dintre acidul arachidonic din membrane şi mediatori naturali sau medicamente. Cisteina accelerează producerea peroxizilor (ROOH) în reacţia catalizată de ioni metalici (Me). GSH peroxidaza şi catalaza descompun excesul de peroxizi, în competiţie cu producerea prostaglandinelor. Reacţiile fiziologice sînt trecute îngroşat, iar cele modulatoare (inhibitoare) prin linii subţiri. După Wargaftig [95]

năm că peroxizi lipidici (determinaţi prin malonic dialdehidă) au fost observaţi în ficat, splină sau plămîni la cîteva ore după inflamaţia indusă experimental cu carrageenină [73]. Recent Bragt [10] a arătat că MDA evoluează paralel cu dezvoltarea granulomului indus experimental.

BIBLIOGRAFIE

1. W. S. ALLISON, *Acc. Chem. Res.*, **9**, 293 (1976).
2. I. ANUNDI, J. HOGBEIN, *Acta Pharm. Toxicol.*, **45**, 45 (1979).
3. D. A. ARMSTRONG, J. D. BUCHANAN, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 743 (1978).
4. K. ASADA, S. KANEMATSU, *Agricult. Biol. Chem.*, **40**, 1891 (1976).

Scanned with OKEN Scanner

5. O. AUGUSTO, G. CILENTO, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **168**, 549 (1975).
6. M. B. BAIRD, H. R. MASSIE, *Clin. Biol. Interact.*, **16**, 145 (1977).
7. M. O. BARKER, M. BRIN, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **166**, 32 (1975).
8. N. H. BAUM, CH. E. MENGE, *J. Lab. Clin. Med.*, **73**, 277 (1969).
9. E. R. BLOCK, *Aviat. Space Environ. Med.*, **48**, 645 (1977).
10. P. C. BRAGT, E. P. SCHENKELAARS, *Prostagl. Med.*, **2**, 51 (1979).
11. L. R. BROWN, K. WUETHNICK, *Biochim. Biophys. Acta*, **488**, 392 (1977).
12. K. S. CHIO, A. L. TAPELL, *Biochemistry*, **8**, 2821, 2827 (1969).
13. B. O. CHRISTOPHERSEN. *Biochem. J.*, 100, 95 (1966).
14. D. A. CLARK, E. L. FOULDS, F. H. WILSON, *Lipids*, **4**, 1 (1969).
15. J. D. CRAPO, D. M. DE LONG, R. T. DREW, *Am. Rev. Resp. Dis.*, **115**, 1027 (1977).
16. G. CUTLER, R. SCHNEIDER, *Atherosclerosis*, **20**, 383 (1974).
17. N. R. DI LUZIO, *Fed. Proc.*, **32**, 1875 (1973).
18. A. T. DIPLOCK, J. A. LUCY, *FEBS Lett.*, **29**, 205 (1973).
19. G. E. DOBRESTOV, N. A. PETROV, *FEBS Lett.*, **84**, 125 (1977).
20. E. D. DOLCI, M. J. BRABEC, *Exp. Molec. Pathol.*, **28**, 96 (1978).
21. S. H. FERREIRA, B. B. VARGAFTIG, *Brit. J. Pharm.*, **50**, 543 (1974).
22. J. R. GALPIN, J. C. ALLEN, *Biochim. Biophys. Acta*, **488**, 392 (1977).
23. H. W. GARDNER, D. WEISLER, R. HLEIMAN, *Lipids*, **11**, 127 (1975).
24. J. GLAVIND, S. HARTMANN, *Acta, Pathol. Microbiol. Scand.*, **30**, 1 (1952).
25. B. GOLDBERG, A. STERN, *J. Biol. Chem.*, **251**, 6468 (1976).
26. B. GOLDBERG, A. STERN, *Acta, Biol. Med. Germ.*, **36**, 731 (1977).
27. B. D. GOLDSTEIN, L. C. HABER, *J. Clin. Invest.*, **51**, 892 (1972).
28. I. M. GOLDSTEIN, M. CIRQUEIRA, *J. Clin. Invest.*, **59**, 249 (1977).
29. K. GRANKVIST, S. MARKLUND, *Biochem. J.*, **182** 17 (1979).
30. J. A. GRAZIANO, D. R. MULLER, *Brit. J. Hematol.*, **32**, 351 (1976).
31. E. M. GREGORY, I. FRIDOVICH, *J. Bacteriol.*, **114**, 1193 (1973).
32. L. S. GRINNA, A. A. BARBER, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, **55**, 773 (1973).
33. D. HARMAN, *J. Gerontol.*, **23**, 476 (1968).
34. R. HIRSCHELMANN, A. STELZNER, *Z. Rheumatol.*, **35**, 403 (1976).
35. Y. HOKAMA, K. YAMADA, E. T. NISHIMURA, *Cancer Res.*, **29**, 542 (1969).
36. M. ISHIHARA, *Clin. Chim. Acta*, **84**, 1 (1978).
37. S. K. JAIN, P. HOCHSTEIN, *Biochim. Biophys. Acta*, **586**, 128 (1979).
38. P. C. JOCELYN, *Biochem. J.*, **117**, 951 (1970).
39. P. C. JOCELYN, „Biochemistry of the SH Groups", Academic Press, London, 1972.
40. R. B. JOHNSTON, J. E. LEHMEYER, *J. Exp. Med.*, **143**, 1551 (1976).
41. R. M. KASCHNITZ, Y. HATEFI, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **171**, 292 (1975).
42. D. A. KOSTER, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **46**, 499 (1978).
43. S. KROS, *Semin. Hematol.*, **13**, 187 (1976).
44. A. A. LAMOLA, T. YAMANE, A. M. TROZZOLO, *Science*, **179**, 1131 (1973).
45. F. LEE, A. P. AUTOR, *J. Pediatrics*, **90**, 105 (1977).
46. T. D. LINDSTROM, M. W. ANDREWS, *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 563 (1978).
47. C. LITTLE, P. J. O'BRIEN, *Biochem. J.*, **106**, 419 (1968).
48. C. LITTLE, P. J. O'BRIEN, *Europ. J. Biochem.*, **10**, 533 (1969).
49. I. MARGINEANU, R. OLINESCU, *St. Cerc. Biochim.* **16**, 209 (1973).
50. P. B. MC CAY, D. D. GIBSON, K. L. FONG, *Biochim. Biophys. Acta*, **431**, 459 (1976).
51. J. MC CORD, *Science*, **185**, 528 (1974).
52. C. E. MENGEL, H. E. KAHN, *J. Clin. Invest.*, **46**, 1715 (1967).
53. T. MIURA, N. OGAWA, T. OGISO, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 1261 (1978).
54. K. D. MUNKRES, *Ageing develop.*, **5**, 171 (1976).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 11

STĂRI PATOLOGICE II (PEROXIZI AI ACIZILOR NUCLEICI)

11.1. PEROXIZI AI ACIZILOR NUCLEICI, MUTAȚII

Deși extrem de importantă, peroxidarea acizilor nucleici (AN) este foarte puțin cunoscută sau admisă, cu atît mai mult cu cît ar constitui un mecanism plauzibil pentru explicarea mutațiilor, bolii de iradiere, fotodermitelor și poate a cancerului. Această situație se datorește pe de o parte, teoretic, lipsei unui mecanism verosimil al peroxidării AN *in vivo*, iar pe de altă parte, practic, imposibilității determinării acestor peroxizi intracelular. De-abia în ultimul timp, noi date au adus unele informații asupra posibilităților și căilor de peroxidare a acizilor nucleici.

Cele mai frecvente surse de mutații sînt ozonul, radiațiile ionizante (RI), ultraviolete (UV) și unele substanțe chimice. După cum se observă în fig. 11.1. A, pentru a-și exercita acțiunea lor mutagenă, sursele sau

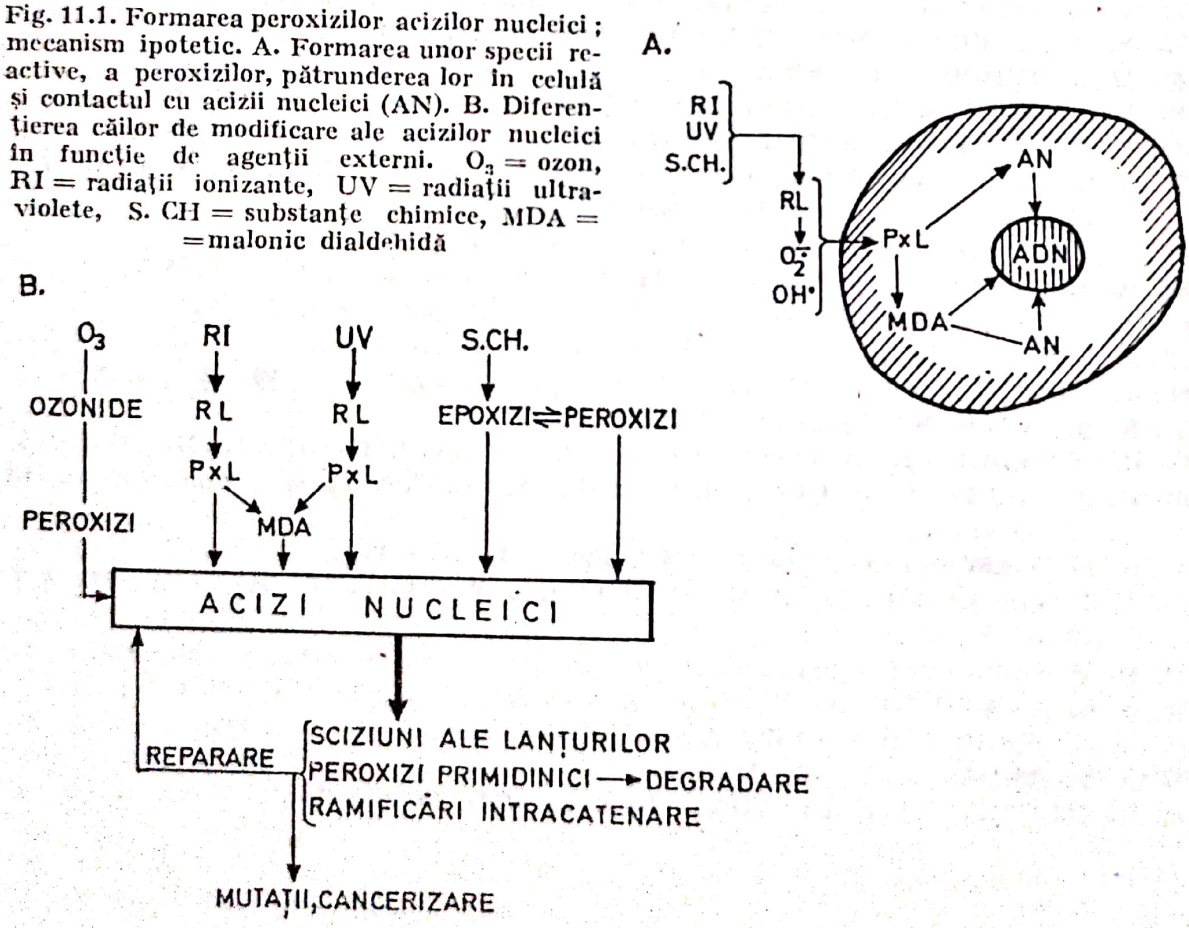


Fig. 11.1. Formarea peroxizilor acizilor nucleici; mecanism ipotetic. A. Formarea unor specii reactive, a peroxizilor, pătrunderea lor în celulă și contactul cu acizii nucleici (AN). B. Diferențierea căilor de modificare ale acizilor nucleici în funcție de agenții externi. O_3 = ozon, RI = radiații ionizante, UV = radiații ultraviolete, S. CH = substanțe chimice, MDA = malonic dialdehidă

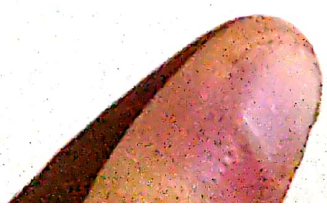
Scanned with OKEN Scanner

agenţii mutageni menţionaţi vor ataca în primul rînd membrana celulară producînd radicali liberi şi peroxizi lipidici (PxL) în funcţie de intensitatea acţiunii lor şi de depăşirea sistemelor protectoare intracelulare (Capitolele 4, 9 şi 10). Din această cauză, efectele expunerii organismelor la acţiunea acestor mutageni nu vor apărea imediat ci gradat în timp. Dintre radicalii liberi formaţi, cît şi dintre speciile active ale O_2 produse, celulele aerobe nu posedă sisteme protectoare faţă de H· şi OH·. Pe de altă parte unii produşi de descompunere ai PxL, aşa cum este malonic dialdehida (MDA), deşi sînt parţial metabolizaţi, pot circula intracelular şi ajunge la AN exercitînd un efect mutagen [67]. Atît MDA, cît şi radicalii H· şi OH· pot întîlni AN existenţi în citoplasmă (acidul ribonucleic ARN şi acidul dezoxiribonucleic, ADN, din plasmide). În fig. 11.1 B se sugerează acţiunea mutagenă a agenţilor amintiţi prin intermediul fie direct al unor radicali liberi, sau prin PxL formaţi din lipide. Formarea acestora poate fi urmărită chimic (prin determinarea MDA sau altor carbonili rezultaţi din descompunerea PxL) sau biologic prin modificările produse prin acţiunea PxL şi a unor radicali asupra AN şi în special ADN [93].

Din fericire, nici aceste determinări nu sînt concludente decît în cazul unei expuneri intense, deoarece sistemele de refacere, de reparare ale modificărilor AN induse de aceşti agenţi vor acţiona eficient. În ultimul timp aceste sisteme de reparare enzimatice au fost studiate atît în cazul radiaţiilor ionizante [79], cît şi al celor ultraviolete [9,43] sau al ozonului [18], iar unele substanţe cancerigene sînt metabolizate într-o oarecare măsură prin sistemul hidroxilant microzomial hepatic (Capitolul 7.5.1).

Într-un recent studiu, Pryor [77] a subliniat importanţa formării MDA în urma scindării termice sau hidrolitice a endoperoxizilor formaţi din peroxizi lipidici. În fig. 11.2 reproducem mecanismul propus de Pryor de formare a MDA. Acest mecanism ţine seama de reacţiile de producere a PxL expuse în Capitolul 2 şi include ca intermediar endoperoxizi analogi structural prostaglandinelor. Aşa cum s-a arătat în Capitolul 7.5.23) au fost izolaţi astfel de endoperoxizi în cursul biosintezei prostaglandinelor din acidul arachidonic, unul din AGPN prezent şi în membranele celulare. După cum s-a indicat în fig. 11.1, acţiunea agenţilor mutageni menţionaţi este diferită (şi va fi studiată separat) pînă la un anumit grad. În timp ce RI şi UV au anumite căi comune cum sînt radicali liberi, PxL, MDA, ozonul produce atît PxL, cît şi peroxizi ciclici şi polimerici [83], iar substanţele chimice formează mai ales epoxizi şi H_2O_2 ca produşi secundari redox.

Oricare ar fi calea, prin radicali liberi sau prin peroxizi ori MDA aceşti mutageni produc prin combinarea speciilor reactive (radicali, Px, epoxizi) cu ADN modificările menţionate în fig. 11.1.B din care ne vom ocupa doar de aşa-zişii peroxizi ai AN. După cum s-a arătat în Capitolul 7.3 şi fig. 7.2.B, bazele pirimidinice şi în special timina constituie partea cea mai labilă din structura AN, iar peroxidul corespunzător timinei este cel mai stabil. Cele mai multe studii asupra peroxizilor AN s-au efectuat prin iradierea acizilor nucleici şi nucleotizilor, şi urmărirea apariţiei unor semnale de rezonanţă electronică de spin (RES). În fig. 11.3, sînt redate principalele semnale RES obţinute prin iradierea AN. Încă nu se cunosc



Scanned with OKEN Scanner

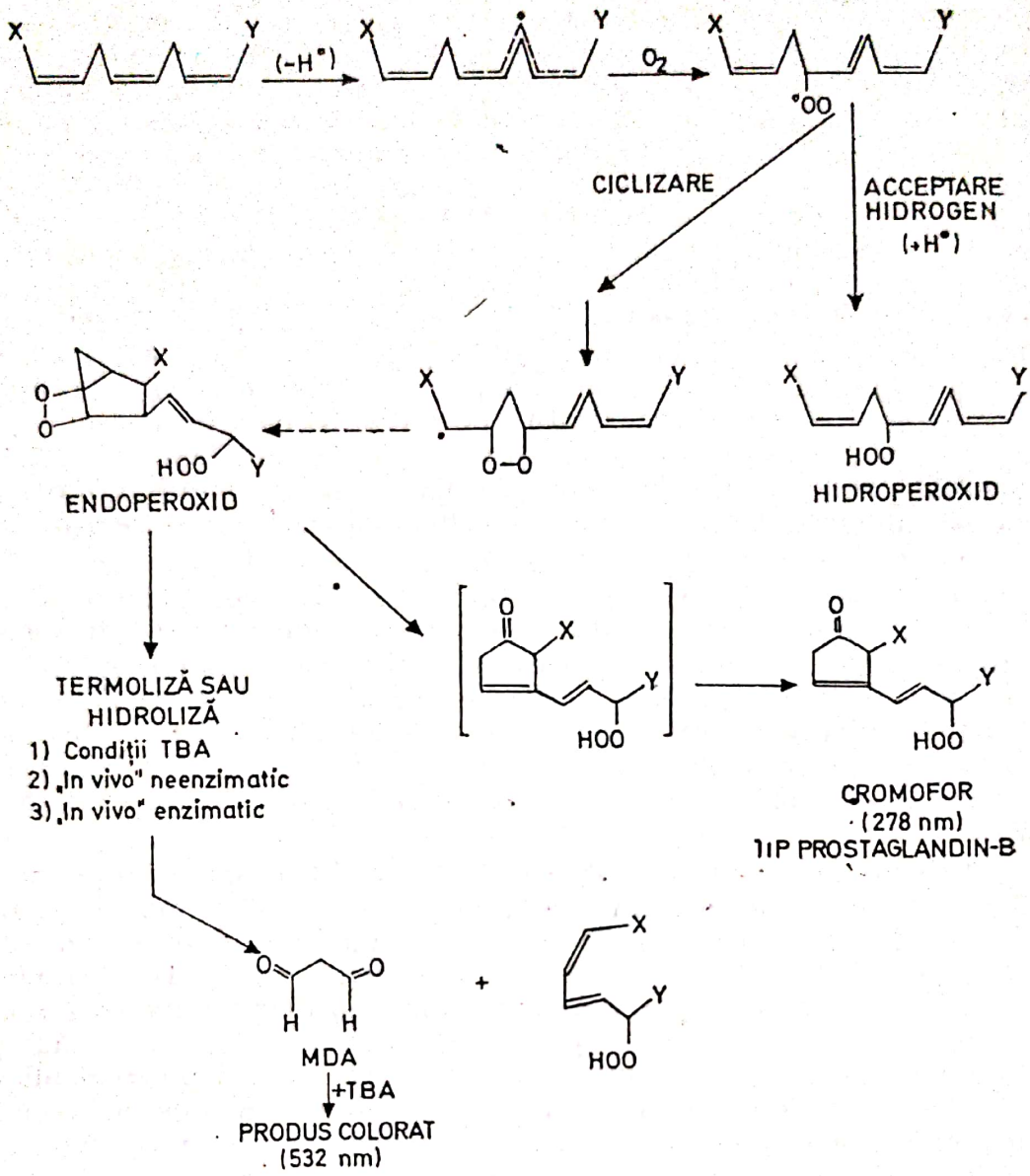


Fig. 11.2. Mecanismul formării endoperoxizilor, hidroperoxizilor şi a unor produşi de descompunere (MDA) din acidul arachidonic, component al membranelor celulare. După Pryor [77].

factorii care produc diferenţele mari în semnalele RES ale AN. Identitatea semnalului cu o lărgime de 140 gauss şi 8 linii din majoritatea spectrelor este compatibilă cu fragmentul de radical liber $-\dot{C}(CH_3)-CH_2-$, care din structura ADN derivă numai din timină. Iradierea cu RI produce în primul rînd un radical liber cu o structură 5,6-dihidrotimidin-5-il, pe lîngă alţi radicali liberi [68]. Efectul oxigenului de a amplifica acţiunea RI sau UV constă tocmai în îmbogăţirea mediului celular cu noi radicali $OH^{\cdot}$ şi pe de altă parte în orientarea transformării radicalilor liberi ai pirimidinelor spre peroxizi [53]. Teoretic, şansele de peroxidare sînt foarte mari. Astfel pentru o doză letală raxe X de 1000 Rads se eliberează

$2{,}5 \cdot 10^{-6}$ moli/l, care vor reacţiona cu AN cu viteze de reacţii mai mari de $10^9\ M^{-1}s^{-1}$, deci aproape de limita de difuziune. Radicalii liberi ai pirimidinelor reacţionează cu O_2 după un proces de pseudoordin întîi în care viteza este proporţională cu concentraţia O_2 şi o constantă de viteză de

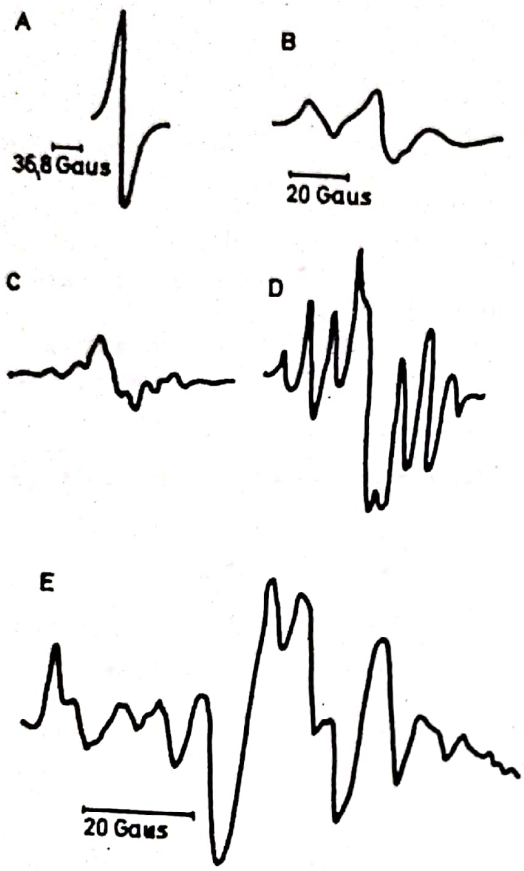


Fig. 11.3. Spectre RES (rezonanţă electronică de spin) ale ADN neiradiat (C şi D) şi iradiat cu radiaţii X. A = timus de viţel, B = spermă de somn. Lărgimea semnalelor probelor C şi D este de 1400 gauss. E = semnalul timinei ($3 \cdot 10^{-2}$ M) după reacţie cu OH· [68].

$1{,}9 \cdot 10^9 M^{-1}s^{-1}$[62]. În celulă însă, speciile reactive au o traiectorie mică datorită absorbţiei de către constituenţi celulari (proteine) şi a acţiunii sistemelor protectoare celulare (Capitolul 9).

Studii *in vitro* pe fibroblaste [30] au indicat o frecvenţă a mutaţiilor de 10^{-5} per locus, per gamete, per generaţie. În acest sens a devenit clar că stabilitatea materialului genetic este în funcţie de balanţa dintre procesele de deteriorare ale ADN şi cele de reparare. Se admite că ADN dintr-o celulă suferă zeci sau sute de modificări chimice ce pot produce mutaţii, dar care sînt reparate eficient şi rapid.

Importanţa peroxizilor acizilor nucleici constă în formarea lor ca intermediari în cursul acţiunii unor agenţi mutageni. Dovezile în favoarea existenţei lor sînt indirecte şi pot fi prezentate schematic :

a) peroxizii înşăşi au un caracter mutagen recunoscut [102] mai ales pe bacterii. Caracterul mutagen al RI şi UV poate fi atribuit tot peroxizilor.

b) H_2O_2 deteriorează ADN (virali, bacterian) şi ARN producînd la o concentraţie de 6 mM aproximativ 600 sciziuni/moleculă care pot fi refăcute prin incubare la 37°C [86]. ADN purificat este de 50 ori mai sensibil.

Scanned with OKEN Scanner

c) inhibarea catalazei cu cianuri sau azidă înaintea iradierii unor celule măreşte mult frecvenţa mutaţiilor, mai ales în mitoză.

d) pretratarea unor insecte cu dihidroximetil peroxid (DHMP) înaintea iradierii măreşte mult frecvenţa mutaţiilor. Acelaşi efect se obţine prin pretratarea celulelor cu aldehida formică, un mutagen recunoscut, care produce H_2O_2 în cursul metabolizării [14]

e) H_2O_2 posedă o acţiune citotoxică, fie direct distrugînd la o concentraţie de 0,5 mM celule tumorale de ascită în 30 minute, ori inactivînd bacteriofagi de tip T sau pneumococi în urma incubării cu un sistem generator de H_2O_2 cum este ascorbat şi ioni de cupru [13, 19]

f) unele substanţe citotoxice (chinone) îşi exercită efectul numai după reducere şi reoxidare *in vivo*, în cursul căruia se dezvoltă H_2O_2 intracelular. O serie de antioxidanţi ca NDGA sau BHT au activitate antimetabolică, protejînd printre altele puii expuşi la viroze [11].

Aceste observaţii, cît şi cele ce vor fi expuse în continuare sprijină ipoteza formării peroxizilor acizilor nucleici. În fig. 11.4 este prezentată

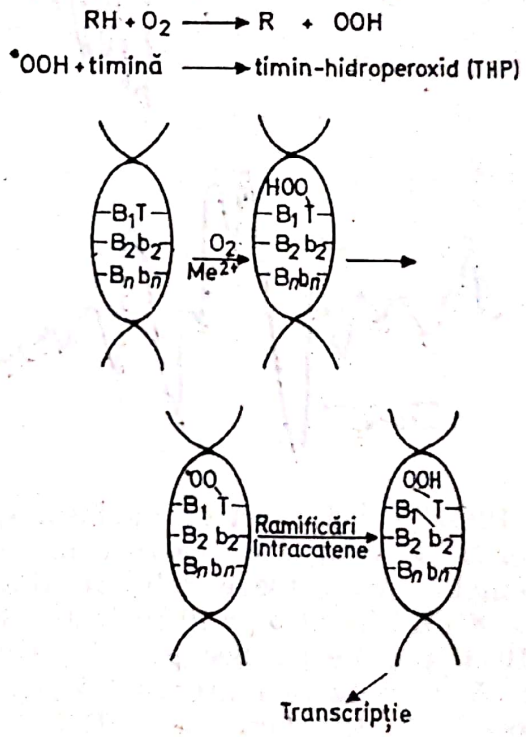


Fig. 11.4. Mecanism ipotetic asupra formării mutaţiilor induse de peroxizi şi implicînd timin hidroperoxidul (THP). După Bland (11).

schema mutaţiilor induse de peroxizi. Timin peroxidul format acţionează similar reactivilor alchilici mutageni în concordanţă cu teoria electrofilică a acţiunii mutagenilor [82].

11.2. ACŢIUNEA FOTODINAMICĂ A UV ŞI OZONULUI

În Capitolele 4.1 şi 4.2 a fost prezentată acţiunea prooxidantă a luminii, în special a UV asupra unor substraturi şi reacţii organice, insistînd asupra intervenţiei speciilor activate ale O_2 şi a formării intermediare a unor peroxizi, mai ales lipidici. De asemenea a mai fost prezentată acţiunea

Scanned with OKEN Scanner

(otosensibilizatoare a unor substanţe, dintre care cele mai importante fclorofila, porfirine) sînt extrase din plante sau animale. Acţiunea mutagenă a radiaţiilor UV a fost recunoscută de mult timp, fiind admisă în etiologia multor boli de piele [56].

Potenţialul mutagen al UV este cuprins între 290—340 nm, la care se adaugă probabil şi acţiunea sinergică a căldurii. Bineînţeles, în producerea unor leziuni cutanate sau mutaţii intervin o serie de factori legaţi de rasă, sex, particularităţi ale epidermei, prezenţa unor substanţe fotosensibilizatoare. Absorbţia fotonilor de către ADN sau aminoacizi se face prin activarea O_2 şi formarea speciilor reactive deja prezentate (fig. 11.1). După studii recente [44, 77], $^1O_2$ este specia reactivă cea mai des detectată în urma interacţiunii UV cu materia vie. Singh şi McIntyre [84] au arătat recent că multe din reacţiile iniţiate de UV sînt mult modificate de 1,3-difenilizobenzofuran, un inhibitor specific al $^1O_2$, în cursul interacţiunii formîndu-se radicali liberi ce generează endoperoxizi şi poliperoxizi. După cum a arătat Pryor [77] UV intensifică mult peroxidarea AGPN indusă de sistemul xantină-xantin oxidază generator de $^1O_2$, $OH\cdot$ (Capitolul 7.2). Reamintim că activarea O_2 se produce şi prin acţiunea fotosensibilizatoare a unor substanţe (Capitolul 4.2).

Cert este că în urma acţiunii UV asupra pielii se produc o serie de radicali liberi cît şi peroxizi lipidici sau produşii lor de descompunere (MDA, baze Schiff) [61]. Ţinînd seama că concomitent cu aceste specii şi determinate de acestea, se produce şi eliberarea unor enzime lizozomiale hidrolitice, apare foarte posibilă acţiunea la distanţă a radicalilor formaţi în urma interacţiei organismelor cu UV. Atît radicalii liberi, cît şi peroxizii lipidici sau produşii de descompunere pot atinge AN şi produce modificări structurale dintre care cele mai importante sînt dimerii pirimidinici ai ADN (fig. 11.5). Scindarea unei catene a ADN, cît şi formarea unui dimer timinic presupun formarea intermediară a peroxizilor timinei [51] ca etapă necesară ruperii catenei ADN şi modificării structurale a timine (Capitolul 7.2). Dacă detectarea peroxizilor timinei *in vivo* este aproape imposibilă, formarea dimerilor timinei determină scindarea punţilor de hidrogen dintre cele două catene ale ADN în regiunea respectivă. Se produce astfel o distorsiune a macromoleculei ADN care împiedică replicarea ADN sau translaţia lui în ARN [30] (fig. 11.5).

Admiţînd posibilitatea repetată a producerii unor astfel de modificări structurale ale ADN sub acţiunea radiaţiilor UV (cît şi a altor mutageni fig. 11.1.) era de aşteptat descoperirea unor sisteme intracelulare de îndepărtare a dimerilor timinei şi de reparare a catenei ADN, deja menţionate. În cazul UV s-au identificat două sisteme enzimatice: unul de fotoreactivare şi altul de reparare a sciziunii catenei. Primul sistem, cel mai bine studiat [9], este constituit dintr-o enzimă specifică îndepărtării dimerilor timinei. Sutherland şi colaboratorii [91] susţin existenţa acestei enzime şi la om, neconfirmată însă de Gianelli [30]. La mamifere, sistemul de reparare este mult mai complex (fig. 11.5) şi este deficitar la pacienţii cu xeroderma pigmentosum, o boală congenitală autosomală recesivă [30] şi în sindroamele Bloom şi Fanconi. Studiul acestor boli fotosensibile au indicat clar că stabilitatea ADN depinde de eficienţa sistemelor enzimatice de reparare, sugerînd indirect posibilitatea unor agresiuni repetate asuprai ADN [43, 56].

Scanned with OKEN Scanner

În sprijinul acestei afirmaţii se găsesc numeroase dovezi în favoarea unei asocieri între iradierea repetată şi abuzivă cu UV sau RI, instabilitatea cromozomială, mutaţii şi o frecvenţă ridicată în cancer. Agenţii fotosensibilizanţi (Capitolul 4.2), care îşi exercită acţiunea fotodinamică prin intermediul $^1O_2$ pot determina mutaţii la organisme inferioare de

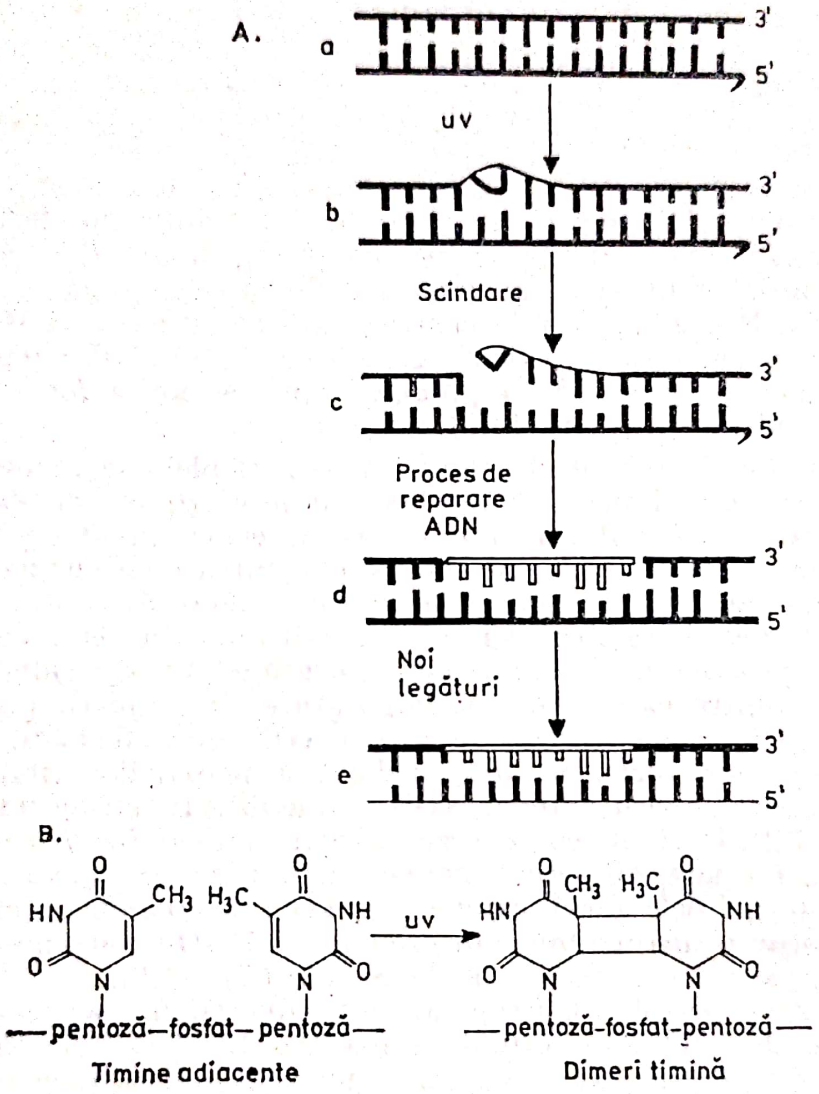


Fig. 11.5. Inducerea unei mutaţii prin radiaţii UV. A. Producerea unei sciziuni catenare în ADN şi repararea defectuoasă. B. Formarea unui dimer al timinei ; nu este prezentat şi formarea intermediară a THP. După Gianelli [29].

tipul *paramecia*, *E. coli*, *Drosophila melanogaster* [56] identice cu cele produse de H_2O_2 şi alţi peroxizi organici la bacterii sau de RI la plante [86]. În cazul plantelor, asocierea UV cu acţiunea fotosensibilizatoare a clorofilei ar putea avea un efect nociv (evident la unii mutanţi), dacă n-ar interveni acţiunea inhibitoare şi protectoare a carotenoizilor, riboflavinei şi tocoferolilor. Lipsa unui factor protector sau o asociere între UV şi fotosensibilizatori de intensitate mare explică

Scanned with OKEN Scanner

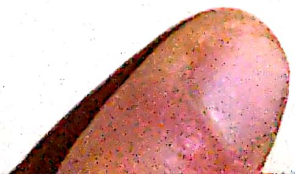
fotodermatozele observate la om și animale datorită substanțelor poluante din dietă sau atmosferă. Lista substanțelor fotoactive este mare și desigur incompletă [56] și include gudronul de huilă și derivați, coloranți de tipul eozină, acridin orange, tripoflavină, medicamente ca fenotiazine și sulfamide și furocumarine (psoraleni) de origine vegetală. Acțiunea fotosensibilizatoare a unor substanțe este atît de mare încît poate ucide unele bacterii ca *Micrococcus leisodeiticus* sau distruge unele tumori. Astfel folosind hematoporfirină [98] sau acridin orange combinat cu un laser cu argon [94] s-au putut distruge tumori experimentale la animale. Această acțiune distructivă fotosensibilizantă este anihilată în prezența 1,3-difenilizobenzofuran, inhibitor specific al formării $^1O_2$ [94].

Bilirubina, produsul principal rezultat din degradarea hemoglobinei, are o acțiune fotosensibilizantă moderată producînd *in vitro* distrugerea membranelor eritrocitare în asociere cu UV concomitent cu formare de $^1O_2$ și peroxizi lipidici [31]. Icterul noului născut, o acumulare de bilirubină în sînge și țesuturi este destul de frecventă la prematuri tratîndu-se prin expunere la soare sau la UV. Acest tratament simplu și eficient nu este atît de răspîndit din cauza cunoștințelor incomplete despre consecințele pe termen lung a distrugerii oxidative a bilirubinei [88].

Un caz deosebit de interesant este al albastrului de metilen, colorant fotosensibilizant, utilizat larg terapeutic, printre altele ca reducător al methemoglobinemiei congenitale sau dobîndite ca urmare a unor intoxicații. În acest caz s-au observat efecte contradictorii, mai ales că în anumite condiții, albastrul de metilen (AM) poate mări cantitatea de methemoglobină din hematie. Smith și Thron [85] au arătat că prin administrarea AM, acesta se acumulează în hematie deoarece forma redusă, leuco, nu poate străbate membrana. În cursul ciclurilor redus $\rightleftharpoons$ oxidat se generează H_2O_2 intracelular, care acționează prin mărirea methemoglobinei. Iluminarea mărește de asemenea cantitatea de H_2O_2, micșorînd efectul terapeutic. Ito [44] și Spikes [88] au arătat că AM prin fotooxidare modifică ADN atît prin degradarea timinei, cît și a 2′-deoxiadenozinei.

Studii recente întreprinse de Greenstock și Wiebe [37] și de Schott horst [81] au arătat că o serie de hidrocarburi cancerigene ca benzopirine sau 2-acetilaminofluoren sînt „activate" în prezența unor coloranți fotosensibilizatori (AM, eozină) și a radiațiilor UV printr-un mecanism ce implică formarea $^1O_2$ și $OH^{\cdot}$. Pe lîngă metabolitul hidrocarburii se mai formează hidroperoxizi și produsele lor de descompunere (epoxizi, MDA).

Cercetarea acțiunii fotodinamice a unor medicamente [81, 88] a indicat implicarea și a unor aminoacizi ca tirozina și triptofan sau peptide ca glutation (GSH). Acțiunea fotosensibilizatoare a clorofilei și porfirinelor asupra triptofanului și tirozinei este cunoscută de mult timp. Astfel Nilsson și Merkel [70] au arătat că fotooxidarea triptofanului indusă de AM și UV se face prin intermediul $^1O_2$, fiind inhibată complet de inhibitori specifici ca 1,3-difenilizobenzofuran (DFBF), azidă sau tetrametiletilen. Principalul produs al fotooxidării triptofanului este *N*-formilkinurenina, substanță fotosensibilizatoare pentru UV peste 230 nm. După Walrant și Santus [95] formarea formilkinureninei în urma fotooxidării triptofanului poate avea loc și pe o cale paralelă, fără apariția $^1O_2$, dar prin formarea unui radical de tip semichinonă.



Scanned with OKEN Scanner

Iradierea UV a celulelor de mamifere sau a unor microorganisme în prezența unor fotosensibilizatori ca hematoporfirina sau riboflavina poate produce moartea și liza celulară din cauza produselor fotooxidării tirozinei și triptofanului [47]. O expunere la UV a veziculelor de reticul sarcoplasmic în prezența coloranților xantinici produce modificări ale membranelor în sensul scăderii incorporării Ca și a activității ATP-azei.

Fotooxidarea rezidiilor triptofan și tirozină din proteine în prezența unor fotosensibilizatori ca hematoporfirina sau coloranți (AM, acridin orange) este o nouă metodă pentru cercetarea structurii proteinelor. Formarea concomitentă a unor radicali derivați din polimeri [28], a $^1O_2$, $HO^{\cdot}$, $O_2^{\cdot-}$ și H_2O_2 contribuie la formarea unor combinații colorant-polimer sau aminoacid-nucleotid utile în studierea unor fotoreceptori [32].

Iradierea în UV (320—400 nm) a unor proteine sau celule în absența fotosensibilizatorilor produce de asemenea foto-oxidarea triptofanului și formarea unor produși în special *N*-formilkinurenina și H_2O_2, care sînt toxici producînd scindări ale catenei ADN, inhibări ale reparării ADN, inhibarea creșterii fibroblastelor în cultură sau a ouălelor de arici de mare, mutații în bacterii de tip *E. coli*, distrugerea unor celule de mamifere în culturi [3, 59, 78]. Aceste efecte au fost verificate și pe cale inversă; prezența H_2O_2 sau a formilkinureninei sensibilizează mult efectul mutagen sau oxidativ al radiațiilor UV asupra unor bacterii, fagi, ADN mono- sau bicatenar [78]. După Pereira și Smith [76] în aceste cazuri ar exista un fotosensibilizator endogen format din riboflavină și compuși înrudiți. Lucrînd pe culturi de fibroblaste de plămîn, diploide, umane, ei au observat produse ale peroxidării lipidelor (MDA, lipofuscină). Acțiunea fotosensibilizantă a riboflavinei și a UV este contrabalansată de antioxidanți endogeni cum sînt vitamina E și GSH. Tot în legătură cu formarea H_2O_2 în urma fotooxidării triptofanului trebuie menționată observația că prin iradierea cu UV se produce inactivarea catalazei [42, 105].

Această ultimă observație experimentală a fost obținută prin iradierea cu UV a cristalinului și a proteinelor din umoarea apoasă din ochi. Zigman și colaboratorii [105] au identificat combinarea ireversibilă a fotoproduselor reacției de iradiere cu catalaza, a cărei activitate a scăzut considerabil. În cristalin și cornee, în urma formării H_2O_2 se produce modificarea acidului hialuronic și a unor proteine determinînd instalarea cataractei (20). În sprijinul acestui mecanism sînt observațiile că în cristalin se găsește o concentrație mare de triptofan și kinurenină combinat cu un glucozid cu rol de reducere a aberației cromatice. Ori în ochi SOD este în concentrație mică, sistemele antioxidante fiind axate pe concentrații mai mari de ascorbat (5 μM) și GSH (3 mM). În consecință, iritarea cronică cu substanțe care prin oxidare produc $O_2^{\cdot-}$ sau H_2O_2 în prezența radiațiilor UV pot iniția procese ce duc la cataractă. O situație similară poate fi extinsă și la efectele tardive ale RI [30, 46].

Un aspect mult înrudit cu acțiunea radiațiilor UV este cea a *ozonului*, O_3. Acest constituent important al atmosferei este și un prooxidant puternic (Capitolul 3.3), inițiind peroxidarea unor hidrocarburi sau a lipidelor din membranele eritrocitare [33] sau din plămîni [101]. Ozonul pare să acționeze diferit de radiațiile UV în special prin intermediul unor

Scanned with OKEN Scanner

compuşi ca ozonide, peroxizi, aldehide şi epoxizi (fig. 11.6) rezultaţi în urma reacţiei O_3 cu AGPN. Majoritatea acestor compuşi sînt mutageni, modificînd structura ADN. În sprijinul acestui mecanism sînt date privitor la creşterea numărului de aberaţii cromozomiale la hamsteri în urma expunerii la 390 $\mu g\ O_3/m^3$ (0,2 ppm) timp de 5 ore, la om după o expunere la 780 $\mu g/m^3$ (0,4 ppm) şi a modificării formării rozetelor de către limfocite [50].

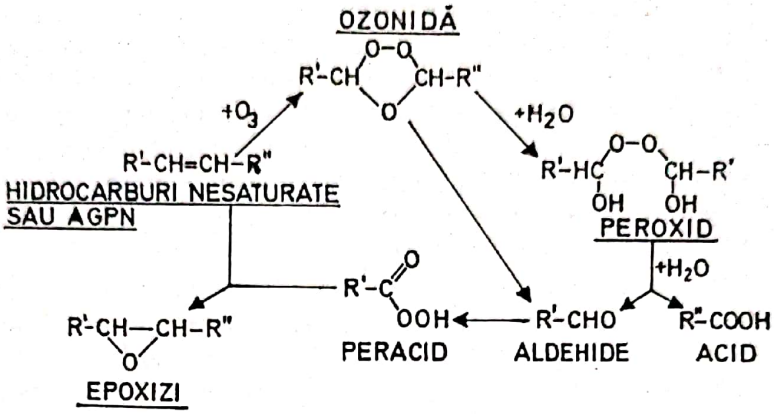


Fig. 11.6. Formarea ozonidelor, peroxizilor şi produşilor de descompunere în urma acţiunii ozonului (O_3) asupra hidrocarburilor nesaturate sau acizilor graşi polinesaturaţi (AGPN). După Kotin şi Falk [50]

Logic, s-a căutat existenţa unei relaţii între aceste experimente şi un eventual rol în geneza carcinoamelor de piele, cu atît mai mult cu cît în atmosferă poluată cu oxizi de azot concentraţia O_3 poate ajunge la 1176 $\mu g/m^3$ (0,6 ppm), nivel atins în regiunea Los Angeles [80]. Cercetările statistice ale lui Leach şi colaboratorii [54] au arătat că între anii 1951 şi 1972, cînd datorită scăderii emiterii radiaţiilor UV de către soare, nivelul O_3 a crescut şi a scăzut numărul carcinoamelor de piele, dar a crescut mortalitatea melanoamelor, tumori fotosensibile [25].

Este interesant de amintit că O_3 se găseşte între 11 şi 45 km altitudine în mod normal, dar între intervalul martie—mai, din cauze încă necunoscute coboară la aproximativ 8 km. Călătorii în avioane de tip jet în această perioadă, zburînd peste pol au acuzat apnee, dureri de cap şi ochi, greţuri etc. Studierea acestui efect este încă în curs, cu atît mai mult cu cît încă nu se cunosc precis procesele fotochimice din atmosferă între O_3, poluanţi chimici, radiaţii UV.

11.3. BOALA DE IRADIERE

Radiobiologia este primul domeniu în care s-a pus problema formării PxL şi a acizilor nucleici drept consecinţă a interacţiei RI cu materia vie. După cum s-a arătat în Capitolul 4.4, în urma interacţiei dintre RI şi molecule organice se produc radicali liberi, la care se mai adaugă speciile reactive ale O_2 rezultate în urma radiolizei apei. Această mare varietate de radicali liberi iniţiază procese de autooxidare, în cursul cărora se produc PxL, produşii lor de descompunere şi au loc modificări structurale ale

Scanned with OKEN Scanner

macropolimerilor organici (Capitolele 6.2—6.4). Aceste ultime modificări sînt asemănătoare celor observate în urma acţiunii radiaţiilor UV sau ale O_3 asupra acizilor nucleici izolaţi, mai ales ADN, prezentate sugestiv în fig. 11.1 şi 11.4.

Deşi peroxizi ai acizilor nucleici au fost observaţi doar în cazul iradierii experimentale a ADN (Capitolul 7.3), existenţa lor şi în urma iradierii *in vivo* este confirmată indirect prin RES (Capitolul 11.1) [53, 62, 68]. Cu toate că sistemele de protecţie celulare (Capitolul 9) şi cele de reparare ale ADN acţionează eficient, totuşi prin depăşirea lor în urma iradierii cu doze mari se pot induce mutaţii, astfel că această metodă a devenit de mult timp [86] larg răspîndită în biologie, microbiologie cu aplicaţii practice mai ales în agrobiologie. La om şi animale sau plante superioare criteriul eficienţei iradierii îl constituie observarea şi numărarea aberaţiilor cromozomiale rezultate în urma interacţiei RI cu ADN.

Desigur, nu este în intenţia noastră de a rezuma radiobiologia, sau boala de iradiere. Problema formării PxL sau cei ai acizilor nucleici nu este clarificată nici acum, deşi în acest domeniu s-a lucrat cel mai intens astfel că problema peroxizilor a constituit subiectul mai multor congrese şi simpozioane internaţionale. Deşi experimentele pe sisteme izolate (iradierea ADN sau a unor celule) aduc dovezi în favoarea formării peroxizilor ca etapă intermediară a acţiunii RI, iradierea unor forme superioare de viaţă a adus argumente controversate. Din păcate, în perioada 1950—1960, cînd această problemă a fost studiată mai mult, cunoştinţele biochimice erau insuficiente pentru o abordare adecvată. Atît studiile despre peroxidarea în medii biologice (Capitolul 7), cît şi sistemele de protecţie (Capitolul 9), metabolismul grupărilor SH, rolul speciilor active ale O_2 sau metode adecvate de determinarea PxL sau a produşilor de descompunere au început să fie cercetate corespunzător evoluţiei tehnice mult mai tîrziu. În consecinţă problema formării PxL şi cei corespunzători acizilor nucleici a rămas deschisă [2, 6, 23].

În fig. 11.7 este prezentată o schemă rezumativă a bolii de iradiere cuprinzînd evoluţia modificărilor în timp la diferite nivele. Ori această schemă deşi sugerează complexitatea procesului nu indică marile diferenţe în declanşarea bolii în funcţie de calitatea radiaţiei. După cum a arătat recent Bisby [10], surse diferite de RI produc variaţii mari în radicalii iniţiali (inclusiv cei ai O_2) producînd o depozitare inegală a radicalilor şi deci a transferului liniar de energie [7].

După cum s-a arătat în Capitolul 4.4, efectul RI este mult amplificat în prezenţa O_2, fapt ce a determinat introducerea noţiunii de „efectul oxigenului". Acest efect poate fi explicat uşor în urma celor menţionate în capitolele 1 şi 4, deoarece această amplificare se datoreşte creşterii numărului de radicali liberi, generatori de modificări ale unor structuri biochimice, prin speciile reactive ale O_2, cum sînt O_2^-, $OH^\cdot$ şi H_2O_2. Aşa se explică că de-abia în ultimii trei ani s-a încercat un nou sistem de radioprotecţie, prin administrarea superoxid dismutazei (SOD) cu rezultate încurajatoare [35] cel puţin pe bacterii. Dealtfel secretul radiorezistenţei foarte mari a bacteriei *Micrococcus radiodurans*, ce poate trăi în apa de răcire a reactoarelor, pare să fie într-o eficientă neutralizare a speciilor reactive ale O_2 [64].

Scanned with OKEN Scanner

H_2O_2 este de asemenea produs în cursul interacțiunii RI cu materia, mai ales în urma radiolizei apei ($1 \cdot 10^{-3}$ M pentru 10^{-4} Rad). În țesuturi, se apreciază la $3-5 \cdot 10^{-6}$ M H_2O_2 produs pentru o iradiere cu 1000 Rads, ce înseamnă destul de puțin în comparație cu $1-10 \cdot 10^{-3}$ M produs pe

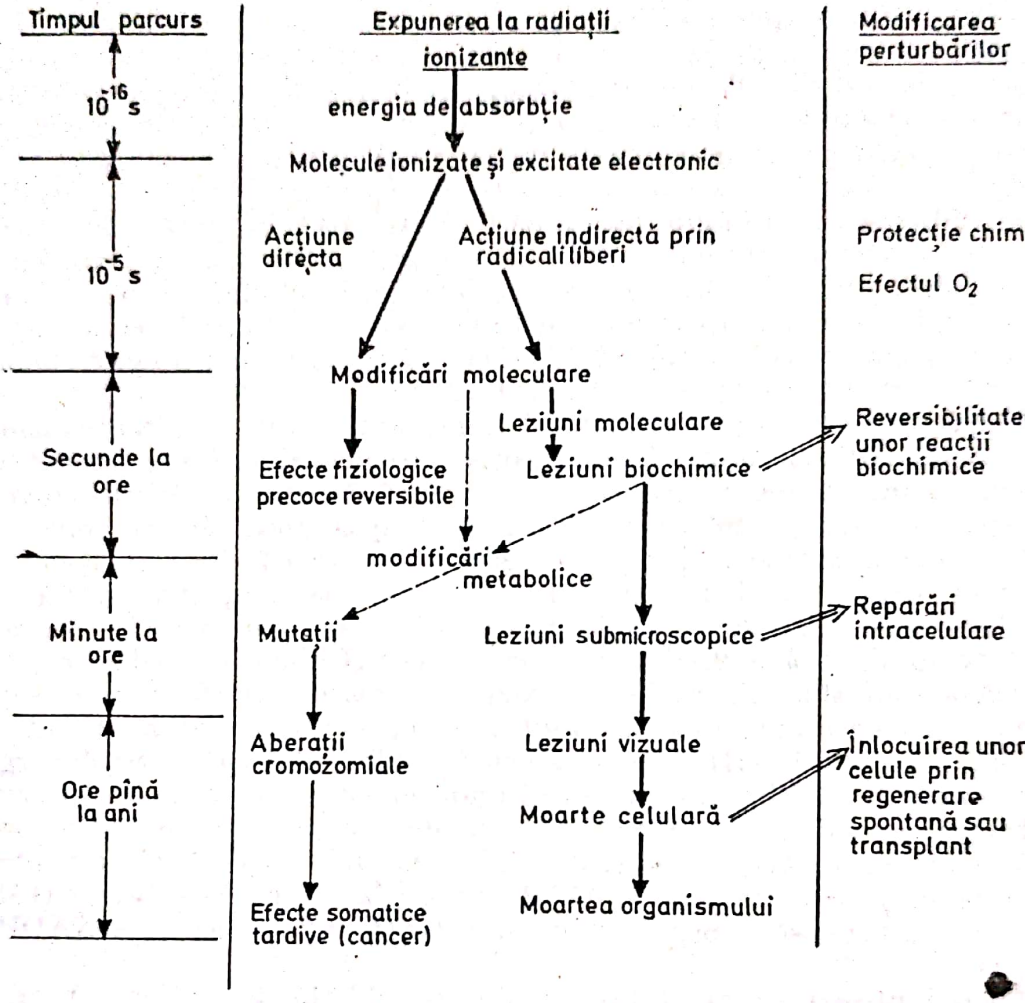


Fig. 11.7. Schema rezumativă a modificărilor biochimice și pato-fiziologice în cursul bolii de iradiere. După Bacq și Alexander [6].

cale metabolică [1]. Studierea comportării catalazei în boala de iradiere nu a dus la rezultate concludente [24, 71], probabil datorită posibilităților de neutralizare a H_2O_2 prin mai multe căi enzimatice (cap. 8 și 9) cît și a prezenței acestei enzime în cantitate destul de mare. Morris și Feinstein [65] au semnalat că unele animale ca șoarecii după iradiere evită apa îndulcită cu zaharină. Olinescu și colaboratorii [73] au arătat că după iradiere, datorită afectării catalazei și GSH peroxidazei la diferite nivele se produc leziuni în cavitatea locală prin creșterea concentrației de H_2O_2, schimbarea florei locale, modificări care determină aversiunea animalelor iradiate față de apa îndulcită.

Formarea peroxizilor lipidici (PxL) constituie însă problema cea mai disputată. Determinarea lor, prin reacția acidului tiobarbiturie cu MDA

Scanned with OKEN Scanner

deşi criticată a constituit metoda cea mai utilizată şi rezultatele au fost neconcludente. Astfel Horgan şi Philpot [43] au obţinut rezultate negative pentru o gamă largă de iradiere. Furnică [28] a arătat că viteza de formare a PxL *in vivo* după iradiere depinde foarte mult de natura ţesutului, astfel că concentraţiile maxime apar după 3 zile în splină, 5 zile în creier şi 7 zile în ficat. Ţinînd seama de existenţa unor numeroase sisteme de protecţie în hematii nu este surprinzător că determinarea PxL în sînge nu au dat rezultate concludente. Wills [99] a arătat că ţesuturile animalelor iradiate au cantităţi variabile de PxL în funcţie de prezenţa antioxidanţilor endogeni sau exogeni şi că omogenatele din organele animalelor iradiate au o tendinţă mult mai mare în oxidarea unor compuşi cum ar fi tioli sau AGPN. Wills şi Wilkinson [100] au observat că formarea PxL în fracţiunile subcelulare ale animalelor iradiate scade în ordinea microzomi > lizozomi > > mitocondrii > nuclei. Oricum, rezultatele neconcludente par să fie datorate în bună parte lipsei unei metode adecvate. Cercetătorii sovietici [7] apreciază conţinutul în radicali liberi şi PxL în serul sanguin prin chemiluminiscenţa spontană apărută după iradiere.

După cum s-a arătat în Capitolul 9, formarea peroxizilor în organisme este controlată de mai multe sisteme protectoare neenzimatice şi enzimatice. Eficienţa mare a acestor sisteme ce acţionează sinergic la diferite nivele subcelulare sau extracelulare explică parţial lipsa unor dovezi concrete. Ca şi în cazul catalazei, sistemele protectoare nu par a fi afectate decît în cazul unor iradieri cu doze letale. În acest sens comportarea grupărilor SH, a GSH şi a GSH peroxidazei este sugestivă. Aşa cum a reieşit din cele prezentate în Capitolele 9.1.5 şi 10.1 grupările SH libere constituie o ţintă preferată a radicalilor liberi şi a peroxizilor. Pentru a face faţă unor surse oxidante fiziologice cum este sistemul xantină—xantin oxidază (Capitolul 7.2 C) sau accidentale (RI, L) componenţii echilibrului SH ⇌ SS din organism menţionaţi au fluctuaţii în jurul unor concentraţii rezultate în urma echilibrului reacţiilor de oxidare şi cele de reducere, cu predominarea acestora din urmă. Aceasta se realizează prin cuplarea reacţiei de neutralizare a peroxizilor catalizată de GSH peroxidază avînd ca substrat GSH, cu şuntul pentozofosfat prin intermediul GSH reductazei şi a NADPH (fig. 9.8).

Ca o confirmare a acestei opinii şi în cazul bolii de iradiere, Olinescu şi Niţă [72] au urmărit modificările grupărilor SH libere şi a GSH peroxidazei în sînge şi ţesuturi de şobolani iradiaţi cu aceeaşi doză de 700 Rads dar cu debite variind cu un ordin de mărime. Doar la debitul mare de 227 R/minut s-a observat o scădere a grupărilor SH şi o creştere a activităţii GSH peroxidazei, deoarece la acest debit cantitatea de radicali şi peroxizi pe unitatea de timp a depăşit capacitatea de protecţie în ciuda creşterii activităţii enzimei. În cazul debitelor medii şi mici, activitatea crescută a enzimei a permis refacerea grupărilor SH afectate chiar în timpul iradierii. În acelaşi context trebuie menţionat că majoritatea radioprotectorilor chimici pun în libertate în organism grupări SH libere şi determină o creştere a concentraţiei intracelulare a GSH. Dealtfel hematia, una din cele mai radiorezistente celule se caracterizează printr-un conţinut bogat în GSH şi în enzimele ce catalizează descompunerea peroxizilor. O concluzie asemănătoare, bazată pe date privitor la radiorezistenţa bacteriilor a fost recent exprimată de Morse şi Dahl [66].

Scanned with OKEN Scanner

Perioada de „stare" a bolii de iradiere (3—10 zile) se caracterizează prin aparenta normalizare a majorităţii parametrilor biochimici modificaţi în primele două zile de la iradiere [6]. În funcţie de doză, după această perioadă apar complicaţii grave cum ar fi infecţii datorită afectării sistemelor imunologice sau o vindecare. Această perioadă ar putea fi explicată

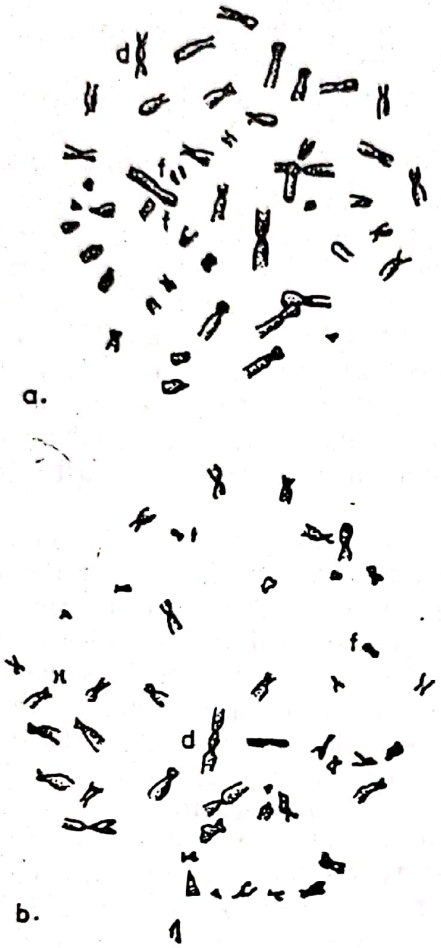


Fig. 11.8. Producerea unor aberaţii cromozomiale în urma iradierii. A. Celule în metafază după prima (a) şi a doua (b) mitoză în urma expunerii sîngelui la 200 Rads, raze X. Se observă în (b) 2 fragmente identice (f) şi unul dicentric (d) derivate prin duplicarea unui singur fragment după prima mitoză. După Meeham [60]

prin producerea unor modificări ale ADN cu repercusiuni tardive mai mult sau mai puţin reversibile. Fără a intra în discutarea acestei importante probleme încă nerezolvate, formarea peroxizilor ADN ar explica caracterul mutant al RI, inducerea de aberaţii cromozomiale persistente în timp (fig. 11.8) şi producerea unor biosinteze defectuoase cu consecinţe în metabolismul intermediar. Pe lîngă cele menţionate la începutul acestui capitol, trebuie menţionat [72] că ADN modificat prin iradiere conţine timin hidroperoxid ce poate servi drept substrat GSH peroxidazei. Reamintim că atît PxL, cît şi produsele lor de descompunere cum este MDA au activitate mutagenă [103] şi pot acţiona la distanţă de locul formării. La stadiul actual al cunoştinţelor, cu toate eforturile întreprinse, problema formării intermediare a peroxizilor în boala de iradiere rămîne actuală. Rezolvarea ei pare să depindă de progresele ce se vor realiza în biochimie şi genetică cu privire la rolul peroxizilor şi consecinţele formării lor.

Scanned with OKEN Scanner

Ţinînd seama de proprietăţile mutagene ale peroxizilor [69, 93] cît şi de participarea lor la modificarea ADN indusă de RI şi UV, implicarea lor în cancerogeneză nu pare surprinzătoare, mai ales că rolul acestor radiaţii în acest sens este verificat practic. Ca şi în cazul radiaţiilor, acţiunea cancerigenă a peroxizilor necesită o acţiune de lungă durată, iar dovezile directe, clare nu sînt suficient de convingătoare.

Dintre numeroasele ipoteze, cea mai interesantă din punctul nostru de vedere este cea emisă de Szent-Györgyi [92]. Aşa cum s-a dovedit (Capitolul 7.1), acum 4 miliarde de ani viaţa era exclusiv anaerobă, cu o organizare simplă, α, şi cu funcţii doar de proliferare şi fermentare. În atmosfera primitivă, în care radiaţiile UV erau principalul catalizator, predominau substanţe reducătoare, donoare de electroni, iar proteinele erau formate din tipul „scoică închisă" (*closed shell*) cu structuri rigide. Odată cu apariţia oxigenului, a apărut un element oxidant capabil să denatureze benzile energetice compensate ale proteinelor, să decupleze perechile de electroni şi să producă radicali liberi. Aşa au apărut noi microstructuri, β, formate din combinarea unora mai simple, mai labile şi care puteau transforma energia chimică eliberată din reacţii în alte forme: mecanică, osmotică, electrică.

Natura a dezvoltat noul sistem diferenţiat β peste cel vechi α ce a rămas ca o matrice, dar păstrîndu-şi funcţiile de proliferare şi fermentare. Pentru păstrarea integrităţii organismului viu, celular, proliferarea structurilor α trebuiau reglate sau inhibate temporar probabil pe calea inhibării grupărilor SH necesare sintezei proteice. În acest scop celula a trebuit să se adapteze la un ciclu reversibil $\alpha \rightleftharpoons \beta$, de alternare a proliferării şi fermentării (α) cu degradare şi inhibare a mitozei, dar eliberatoare de energie (β). Szent-Györgyi presupune că O_2 a indus transformarea $\alpha \rightleftharpoons \beta$ prin preluarea unor electroni de la proteine prin intermediul unor acceptori de un electron, probabil de tip carbonil, C=O. Cel mai simplu carbonil existent în organisme este metilglioxalul $HCO(CO)CH_3$, un bun acceptor de electroni şi inhibitor al grupărilor SH, deci al diviziunii celulare. Metilglioxalul prin reacţie cu amine biologice (catecolamine) produce radicali liberi puternic coloraţi, reacţia fiind catalizată de peroxidază. Catalaza, acţionînd peroxidazic (Capitolul 9.3) activează de asemenea această reacţie. Deci după Szent-Györgyi [92] cancerul ar fi o dereglare a reglării mitozei şi a mecanismelor adiacente, a trecerii ciclice între două faze distincte ale vieţii celulei. Această trecere ciclică se produce prin profunde modificări structurale, mai ales ale membranelor subcelulare, în care peroxidarea lipidelor face parte integrantă. Orice reacţie de lungă durată ce produce sau interferă cu radicalii liberi poate declanşa o perturbare a reglării mitozei şi induce modificări ale ADN endogen (mutaţie) sau al unui virus latent prezent în celulă. Ipoteza implicării radicalilor liberi în cancerogeneză este mai veche [36] decît cea a lui Szent-Györgyi, dar acesta i-a dat o formă explicativă.

Atît RI, cît şi UV în urma absorbţiei de către organism produc radicali liberi care formează peroxizi şi mutaţii, ce pot declanşa ulterior cancer [38]. Dealtfel RI amplifică mult proprietăţile cancerigene ale unor

Scanned with OKEN Scanner

hidrocarburi ca metilcolantren, benzantracen etc. Or numitorul comun atît în acţiunea radiaţiilor, cît şi a hidrocarburilor cancerigene este tot H_2O_2 ce se formează atît metabolic (Capitolul 8) cît şi ca produs al metabolizării prin procese redox al multor substanţe [96]. Or H_2O_2 poate deriva din $O_2^{\cdot-}$ prin reacţia Haber-Weiss (Capitolul 1) aşa încît în multe laboratoare s-au studiat atît producerea radicalilor liberi ai O_2, cît şi enzimele implicate în descompunerea lor din tumori comparativ cu ţesuturile corespunzătoare normale. În privinţa producerii H_2O_2 şi a $O_2^{\cdot-}$ de către tumori, unele rezultate indică doar o sensibilitate a acestora la efectul citotoxic al acestor specii [98]. În schimb unele lucrări recente [8, 21] au indicat o lipsă în tumori a superoxid dismutazei (SOD) sau cel puţin mult scăzută. Bozzi şi colaboratorii [12] au confirmat de asemenea nivelul foarte mic al catalazei în tumori, constatare comunicată încă acum 25 ani [36]. Ţinînd seama că o bună parte din H_2O_2 produs provine din dismutarea $O_2^{\cdot-}$ datorită reacţiei catalizată de SOD (Capitolele 8 şi 9.2) se pune întrebarea de unde provine H_2O_2 în tumori, cu atît mai mult cu cît în acestea predomină un metabolism scăzut, glicolitic anaerob. Răspunsul este departe de a fi găsit. După Dionisi şi colaboratorii [22] mitocondriile celulelor tumorale nu produc H_2O_2 (Capitolul 8.1.4) ci numai $O_2^{\cdot-}$. O altă sursă de $O_2^{\cdot-}$ ar fi citocromul P450 (Capitolul 7.5.1) dar care se găseşte în tumori la un nivel scăzut [8], deşi Bachur şi Gordon [5] susţin că prin intermediul acestuia acţionează medicamentele anticancerigene adriamicina, mitomicina, daunorubicina formînd radicali liberi, $O_2^{\cdot-}$, şi chinone ce se leagă puternic de ADN. Bozzi [12] susţine că sînt unele tumori (tip Yoshida) care nu sînt atît de sensibile la H_2O_2 generat extern (deci şi radiorezistente) datorită unui sistem GSH—GSH peroxidază activ. Tumorile de tip Ehrlich, care au o activitate scăzută în acest sistem sînt radiosensibile. Atît RI, cît şi acţiunea citotoxică a UV pot fi mimate prin prezenţa H_2O_2 (sau $^1O_2$) care în concentraţii în jur de 1 mM produce liza unor celule tumorale acţionînd la nivelul membranei [5]. Recent Saito şi Imuta [78] au observat că H_2O_2 produs de sistemul xantină-xantin-oxidază modifică transformarea blastică a limfocitelor acţionînd atît prin perturbarea glicolizei generatoare de energie, cît şi prin alterarea sintezei ADN. Menţionăm de asemenea că limfocitul este una din cele mai radiosensibile celule [63].

Un alt aspect al implicării peroxizilor în neoplazii este oferit de hidrocarburile policiclice aromatice de tip benzopiren, destul de răspîndite în mediul înconjurător şi care prin metabolizare dau produşi cu mare activitate cancerigenă. Efectul cancerigen al acestor hidrocarburi este atît de evident încît servesc drept model devenit clasic de producere a cancerului experimental pe cale chimică. Aceste hidrocarburi aromatice (benzopiren, metilcolantren, α-benzantracen etc.) sînt metabolizate în reticulul endoplasmic (microzomi) din ficat şi alte ţesuturi cu producere de mai mulţi intermediari, mai mult sau mai puţin cunoscuţi. Se pare că primul intermediar ar fi un arenoxid, din care majoritatea sînt toxici, mutagenici şi cancerigeni [55]. Aceşti arenoxizi pot fi consideraţi ca epoxizi şi sînt hidrataţi în dihidrodioli şi diolepoxizi de către epoxid hidrază, după care urmează secvenţe de reacţii de inactivare proprii fiecărei hidrocarburi. În fig. 11.9. A este prezentată metabolizarea stirenului monomer,

Scanned with OKEN Scanner

utilizat în unele ambalaje pentru alimente din care poate trece în organism. În Capitolul 3.4. s-a arătat că unii epoxizi pot trece în peroxizii corespunzători, aceeași transformare reversibilă observîndu-se și în organisme

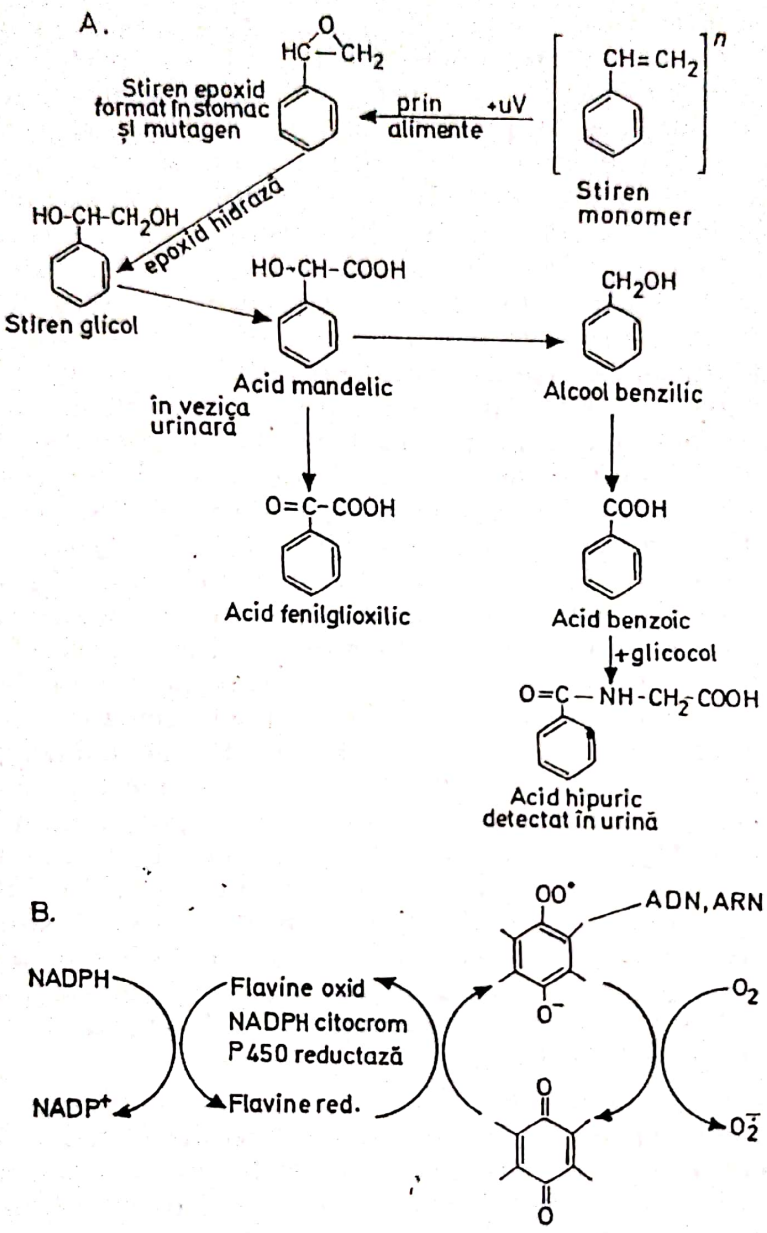


Fig. 11.9. Formarea epoxizilor și acțiunea chinonelor. A. Metabolizarea stirenului preluat din polistirenul din componența unor ambalaje prin alimente. B. Mecanism ipotetic privitor la metabolizarea unor chinone cu acțiune mutagenă de către sistemul microzomial hepatic și legarea lor de acizii nucleici. După Bachur [5].

[38, 75]. Epoxizii sînt electrofili și formează spontan legături covalente cu părți nucleofile ale ADN prin reacții în care se produc $O_2^{\cdot-}$ și $OH^{\cdot}$ [49]. După Bland [11], hidrocarburile cancerigene produc prin metabolizare $^1O_2$ și hidroperoxizi care facilitează combinarea cu ADN.

Un rol cheie în rezistența la acțiunea cancerigenă a unor substanțe chimice pare să-l aibă epoxid hidraza (E.C.4.2.63) cu localizare microzomială și inductibilă ca și alte enzime componente ale metabolizării multor substanțe (Capitolul 7.5.1). Această enzimă are un rol încă neclar deoarece produce atît activarea, cît și inactivarea hidrocarburilor aromatice, este indusă atît de aceste substanțe, dar și de o serie de antioxidanți sintetici ca BHT, BHA, ethoxiquine etc. [49] ce micșorează efectul cancerigen al hidrocarburilor, și mai prezintă multe particularități cinetice (*p*H optim în funcție de substrat, influență marcată a lipidelor, specificitate mică) [36, 55, 58]. Organismul mai dispune de o cale de detoxifiere pentru epoxizi prin conjugare cu GSH prin reacția catalizată de GSH-*S*-transferază [97]. Trebuie amintit că la rumegătoare, partea epoxidică a hidrocarburilor aromatice este redusă la olefine prin intervenția florei microbiene; după Ivie [45] un proces similar, dar de mai mică amploare, ar avea loc și în intestinul mamiferelor și are avantajul inactivării epoxizilor înaintea absorbției.

Revenind la epoxizi, trecerea lor reversibilă în peroxizi încă nu este clară. Incubarea microzomilor cu benzopiren produce un semnal RES abolit de prezența antioxidanților [15], în cursul metabolizării hidrocarburilor cancerigene s-au detectat cantități crescute de MDA [52, 87]. Furnică [27] leagă formarea peroxizilor în tumori de scăderea considerabilă a activității catalazei, semnalată anterior. Totuși nu s-au găsit relații între PxL și gravitatea bolii.

Antibioticele antitumorale folosite terapeutic ca adriamicina, daunomicina, bleomicina, streptonigrina, mitomicina etc. prin metabolizare în microzomii hepatici produc radicali liberi detectați prin RES [90], dar și $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 și peroxizi lipidici ce determină efectele cardiotoxice cunoscute [34]. Ca și în cazul hidrocarburilor, formarea $O_2^{\cdot-}$ ajută la legarea acestor antibiotice de ADN. După Bachur și Gordon [5] aceste antibiotice sînt metabolizate de către NADPH-citocrom P450 reductaza microzomială în chinone și radicali liberi ce inițiază formarea de peroxizi cu efecte citotoxice. Dealtfel legarea formelor chinonice ale acestor antibiotice de ADN este inhibată de SOD și catalază [57].

Datele prezentate justifică abordarea implicării peroxizilor în neoplazii, dar nu oferă suficiente argumente pentru stabilirea importanței acestei probleme. După Szent-Györgyi [92], peroxizii simbolizează o dereglare a unor transformări fiziologice induse de agenți externi. În fig. 10.A. este redat modelul cancerogenezei chimice după Greenstock [37], după care activarea prin diferite surse a unor precancerigeni (lipide, hidrocarburi etc.) în cancerigeni (epoxizi) determină combinarea lor cu acizi nucleici (ținta) într-un complex ce determină inducerea tumorii. În fig. 11.10. B, Argos și Arcos [4] completează mecanismul de mai sus indicînd și șansele de supraviețuire. Marea varietate în răspunsul organismelor la agenții cancerigeni poate fi datorită parțial și căilor de neutralizare a epoxizilor, compuși cheie, pe care celulele le-au adaptat în cursul diferențierii. Numai prin depășirea acestor căi epoxizii se pot acumula în cantități suficiente pentru a realiza mutații durabile sau a determina un proces tumoral. Aprofundarea legăturii radicali liberi-peroxizi-epoxizi va contribui mult la înțelegerea mecanismelor implicate în cancerogeneză și într-o terapie adecvată.

Scanned with OKEN Scanner

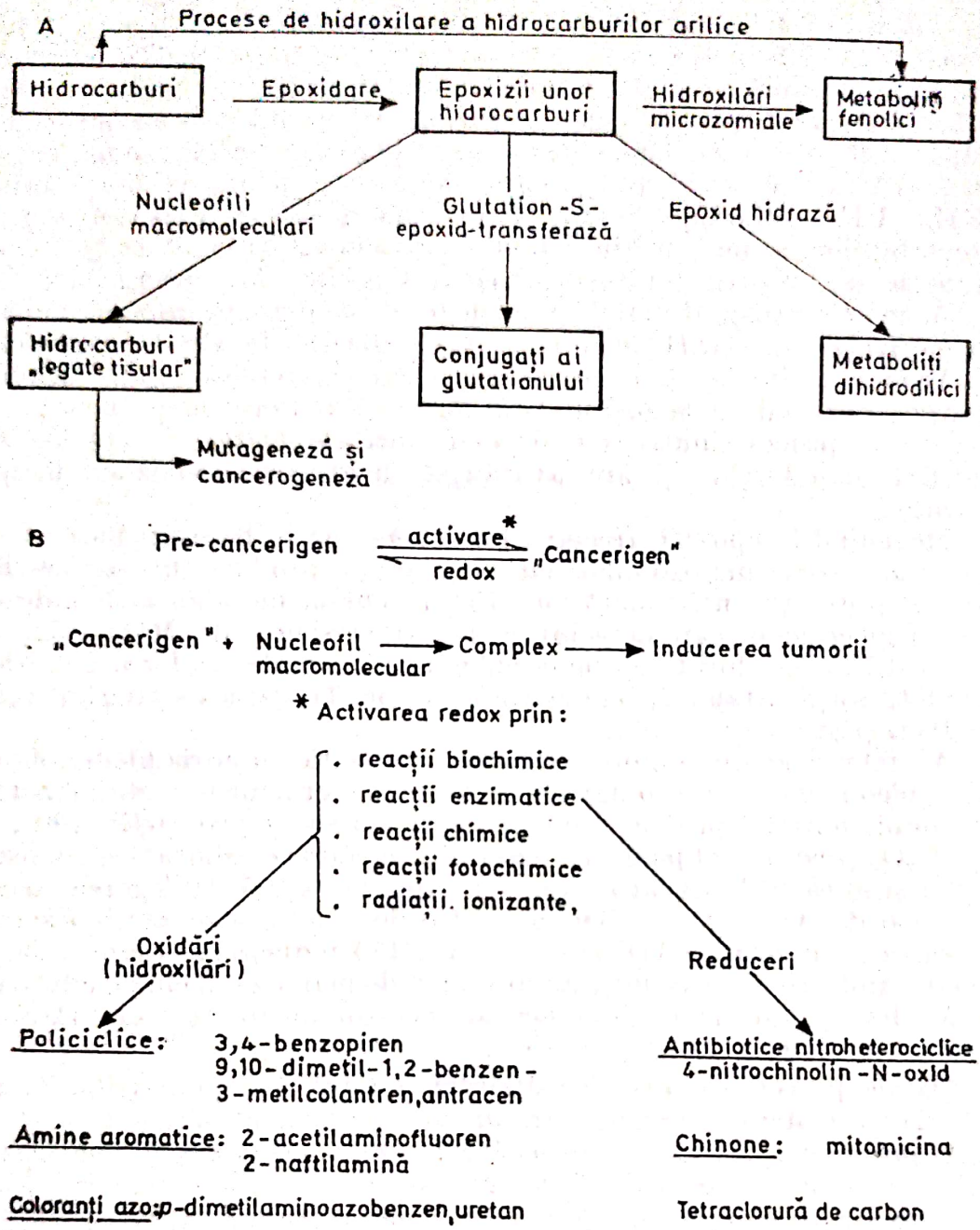


Fig. 11.10. Mecanisme ipotetice ale cancerizării pe cale chimică. A. Metabolizarea unor hidrocarburi cancerigene, rolul central al epoxizilor și căile metabolice diverse implicate, După Argus [4]. B. Reacția de activare a unor substanțe cu acțiune cancerigenă și cea ulterioară, de legare cu partea nucleofilică a compușilor macromoleculari (acizi nucleici). După Greenstock [38].

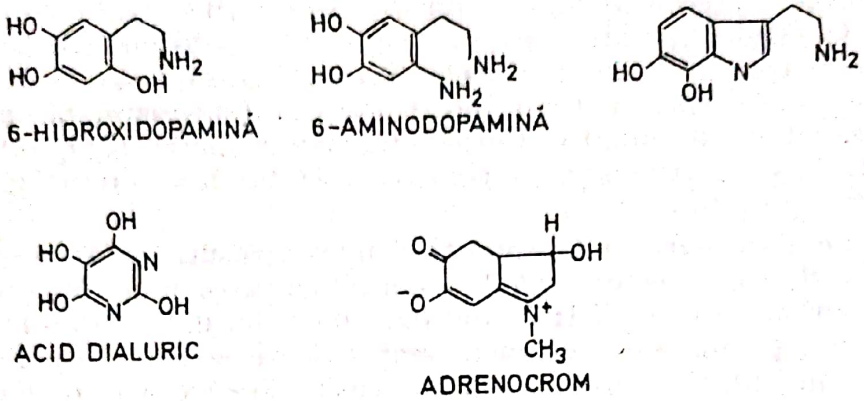
11.5. PEROXIZII — AGENȚI CITOTOXICI

Activarea O_2 și formarea speciilor reactive $O_2^{\cdot-}$, $^1O_2$ și mai ales H_2O_2 sînt necesare vieții pentru modificarea membranelor biologice (Capitolul 10), inițierea multor procese (Capitolele 7 și 8), eliminarea unor celule bătrîne (Capitolul 10.3.2) și chiar arme de apărare (fagocitoza, Capitolele 8.2, 8.3).

Scanned with OKEN Scanner

Capacitatea citotoxică a peroxizilor a mai fost abordată în Capitolele 8, 10 și 11 arătîndu-se că H_2O_2 este peroxidul cel mai utilizat atît în natură, cît ca și rezultat indirect al metabolizării unor substanțe. Aspectul citotoxic al H_2O_2 legat de cancerogeneză a fost discutat mai înainte, dar în ultimii ani s-au acumulat date despre formarea acestuia în urma acțiunii unor neurotoxici a căror structură este dată în fig. 11.11. 6-hidroxidopamina

A.



B.

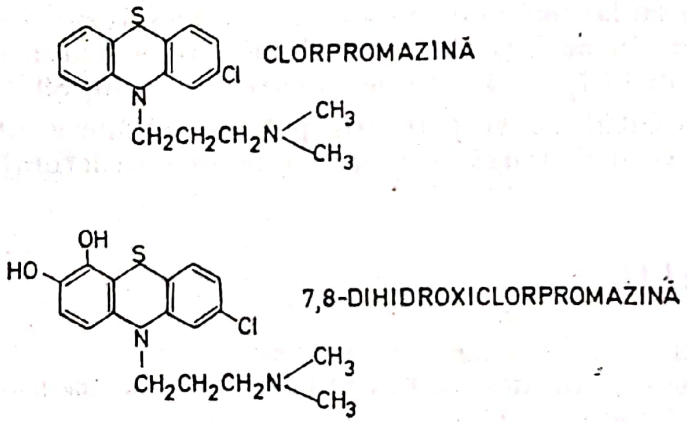


Fig. 11.11. Substanțe cu acțiune neurotoxică A. Derivați ai unor mediatori neurochimici. B. Fenotiazine cu acțiune terapeutică (clorpromazina) și toxică (7,8-dihidroclorpromazina).

și 6-aminodopamina sînt analogi ai dopaminei, care în urma administrării la animale se acumulează în neuroni, distrugîndu-i. Ambele substanțe produc $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$ și H_2O_2 [17, 41]. 6,7-Dihidroxitriptamina, analog al serotoninei, distruge neuronii și terminațiile bogate în acest mediator [16]. Acidul dialuric produce hemoliză la animale cu deficit în vitamina E, iar sub formă oxidată (aloxan) produce diabet prin distrugerea celulelor secretoare de insulină; în ambele cazuri se formează și H_2O_2 [104]. Adrenocromul rezultat din oxidarea adrenalinei prin intermediul $O_2^{\cdot-}$ [74, 104] este mitotic. Pe de altă parte, fenotiazinele, o clasă de medicamente larg folosită în tratamentul schizofreniei acționează asupra formării $O_2^{\cdot-}$ și H_2O_2. În timp ce clorpromazina (fig. 11.10 B), medicamentul de bază inhibă formarea acestor specii, 7,8-dihidroxiclorpromazina și alte *orto-*

Scanned with OKEN Scanner

dihidroxifenotiazine produc aceşti radicali şi determină leziuni grave dermice şi oculare [39]. Implicarea acestor substanţe şi deci a H_2O_2 în etiologia unor boli mintale nu este încă sprijinită de suficiente dovezi, dar în creier s-a găsit un nivel crescut de activitate a superoxid dismutazei şi redus în catalază [40].

Un domeniu foarte diferit, dar legat de cel precedent tot prin H_2O_2, este cel al virulenţei unor bacterii. Recent Joskett [48] a arătat că virulenţa bacilului *Mycobacterium tuberculosis* este strîns legată de rezistenţa la H_2O_2. O virulenţă redusă este asociată cu o sensibilitate la acţiunea H_2O_2 şi cu un conţinut mic în catalază. Acţiunea citotoxică a H_2O_2 este atît de mare încît afectează şi sporii unor bacterii, fiind superioară unor dezinfectanţi ca fenol sau radiaţii. Rezistenţa bacteriilor la H_2O_2 diferă mult la diferite suşe şi virulenţa lor trebuie asociată cu acţiunea fagocitară a leucocitelor (Capitolul 8.2).

Pe de altă parte infectivitatea unor virusuri ca *Herpes simplex* sau *Newcastle* (letal pentru păsări domestice) este mult micşorată prin hrănirea animalelor cu BHT (hidroxitoluen butilat, Capitolul 5) atît curativ cît şi profilactic. Acţiunea terapeutică a acestui antioxidant larg folosit în alimentaţie asupra acestor virusuri are loc atît *in vivo*, dar şi *in vitro*. După Brugh [13], aceste virusuri sînt legate de o membrană bogată în lipide cu care se combină BHT. Reamintim că BHT poate fi şi toxic pentru larvele unor insecte sau să micşoreze creşterea unor celule în cultură, dar în acelaşi timp să inhibe carcinogeneza chimică, hepatotoxicitatea prin CCl_4 şi să întîrzie îmbătrînirea [46, 89].

Antioxidanţii, ca şi peroxizii pot să acţioneze atît în favoarea vieţii, dar şi să o distrugă, sau să o modifice structural.

BIBLIOGRAFIE

1. H. I. ADLER, *Rad. Res. Suppl.* **3**, 110 (1963).
2. K. I. ALTMAN, S. OKADA, G. B. GERBER, „Radiation Biochemistry", vol. 2 Academic Press, New York, 1970.
3. H. N. ANANTHASWAMY, A. EISENSTARK, *Photochem. Photobiol.*, **24**, 439 (1976).
4. M. F. ARGUS, J. C. ARCOS, *J. Theor. Biol.*, **56**, 491 (1976).
6. Z. M. BACQ, P. ALEXANDER „Fundamentals of Radiobiology", Chap. 1, 13, Pergamon Press, Oxford, 1966.
5. N. R. BACHUR, S. L. GORDON, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **76**, 954 (1979).
7. V. A. BARABOI, V. E. OREL, *Radiobiologhia*, **18**, 307 (1987).
8. G. M. BARTOLI, T. GALEOTTI, A. AZZI, *Biochim. Biophys. Acta*, **497**, 622 (1977).
9. D. BILLENE, „Biological Repair Mechanisms", NTIS, Springfield, 1978.
10. R. H. BISBY, R. B. CUNDALL, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 825 (1978).
11. F. BLAND, *J. Chem. Educ.*, **55**, 153 (1978).
12. A. BOZZI, I. MAVELLI, B. MONDOVI, *Cancer Biochem. Biophys.*, **3**, 135 (1979).
13. M. BRUGH, *Science*, **197**, 1291 (1977).
14. D. BURK, M. WOODS, *Rad. Res., Suppl.*, **3**, 212 (1963).
15. L. M. CALLE, P. D. SULLIVAN, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **85**, 351 (1978).
16. G. COHEN, R. E. HEIKKILA, *J. Biol. Chem.*, **249**, 2447 (1974).
17. G. COHEN, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 669 (1978).

Scanned with OKEN Scanner

18. R. S. COLLINS, R. T. JOHNSON, *J. Cell Physiol.*, **99**, 125 (1979).
19. A. CRUCEANU, J. KOCH, *Rev. Roum. Inframicrobiol.*, **8**, 153 (1971).
20. M. DELMELLE, *Photochem. Photobiol.*, **29**, 713 (1979).
21. G. DINESCU ROMALO, C. MIHAI, *Cell Molec. Biol.*, **24**, 1 (1979).
22. O. DIONISI, T. GALEOTTI, A. AZZI, *Biochim. Biophys. Acta*, **403**, 292 (1975).
23. J. I. FABRIKANT, „Radiobiology Year Book, Medical Publ.", Chicago, 1972.
24. R. N. FEINSTEIN, D. M. NELSON, *Kerntechnik*, **13**, 400 (1971).
25. C. C. FELIX, J. S. HYDE, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **84**, 335 (1978).
26. M. FREDERIKSSON, J. BRANDT, L. O. ANDERSON, *Biochemistry*, **13**, 4758 (1974).
27. M. FURNICA, *Rev. Roum. Biochim.*, **1**, 279 (1964).
28. M. FURNICA, M. DANICEL, *Fiziol. Norm. Patol.*, **14**, 173 (1968).
29. F. GIANELLI, *Proc. Roy. Soc. Med.*, **70**, 388 (1977).
30. F. J. GIBLIN, W. N. REDDY, „Lens Ageing and Development of Senile Cataracts", edit. D. A. Okwen, S. Krager, Basel, p. 94, 1967.
31. A. W. GIROTTI, *Biochemistry*, **14**, 3377 (1975).
32. A. F. D. GOEIJ, R. J. VAN STRAALEN, *Clin. Chim. Acta*, **71**, 485 (1976).
33. B. D. GOLDSTEIN, O. J. BALCHUM, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **126**, 356 (1967).
34. J. GOODMAN, P. HOCHSTEIN, *Biochem. Biophys, Res. Comm.*, **77**, 797 (1977).
35. S. A. GOSCIN, *Rad. Res.*, **56**, 565 (1973).
36. J. P. GREENSTEIN, „Biochemistry of Cancer", Academic Press, New York, 1954.
37. C. L. GREENSTOCK, R. H. WIEBE, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 863 (1978).
38. C. L. GREENSTOCK, G. W. RUDDOCK, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 877 (1978).
39. J. W. HARTZ, S. FUNAKASHI, *Clin. Chim. Acta*, **46**, 125 (1973).
40. R. E. HEIKKILA, G. COHEN, *Photochem. Photobiol.*, **24**, 363 (1975).
41. R. E. HEIKKILA, F. S. CABBAT, *Res. Comm. Chem. Pathol.*, **17**, 649 (1977).
42. R. M. HERRIOT, *Analyt. Biochem.*, **95**, 77 (1979).
43. V. J. HORGAN, C. T. PHILPOT, *Brit. J. Radiol.*, **27**, 63 (1954).
44. T. ITO, *Photochem. Photobiol.*, **28**, 493 (1978).
45. G. W. IVIE, *Science*, **191**, 959 (1976).
47. G. JORI, *Photochem. Photobiol.*, **21**, 463 (1975).
48. P. S. JOSCKETT, V. R. ABER, *J. Gen. Microbiol.*, **104**, 37 (1978).
49. R. KAHL, U. WULFF, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **47**, 217 (1979).
50. P. KOTIN, H. L. FALK, *Rad. Res., Suppl.*, **3**, 193 (1963).
51. C. LANGERCRANZ, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 220 (1973).
52. V. S. LANKIN, A. M. GHERASIMOV, *Biohimia*, **43**, 235 (1978).
53. R. LATARJET, B. EKERT, *Rad. Res. Suppl.* **3**, 247 (1963).
54. J. F. LEACH, P. C. BEADLE, *Aviat. Space Environ. Med.*, **3**, 512 (1978).
55. W. LEVIN, P. E. THOMAS, A. Y. H. LU, *Molec. Pharmacol.*, **14**, 1107 (1978).
56. S. LONGHIN, A. POPESCU, „Fotodermatoze", Ed. Acad. R.S.R., Bucureşti, 1972.
57. J. W. LOWN, S. K. SIM, H. H. CHEN, *Can. J. Biochem.*, **56**, 1042 (1978).
58. A. Y. H. LU, *J. Biol. Chem.*, **254**, 5878 (1979).
59. J. P. MC CORMICK, J. R. FISCHER, J. P. PACHLATKO, *Science*, **191**, 468 (1976).
60. T. MEEHAM, K. STRAUB, *Nature*, **277**, 756 (1979).
61. H. MEFEERT, W. DIEZEL, N. SONNICHEN, *Experientia*, **32**, 1397 (1976).
62. H. B. MICHAELS, J. W. HUNT, *Analyt. Biochem.*, **87**, 135 (1978).
63. E. C. MILLER, J. A. MILLER, „Molecular Biology of Cancer", edit. H. Brush p. 377, Academic Press, New York, 1974.
64. R. E. MITCHEL, *Rad. Res.*, **79**, 63 (1979).
65. D. D. MORRES, R. N. FEINSTEIN, *Nature*, **222**, 688 (1969).
66. M. L. MORSE, R. H. DAHL, *Nature*, **271**, 660 (1978).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul 12

DETERMINAREA PEROXIZILOR ȘI A COMPUȘILOR ÎNRUDIȚI

12.1. GENERALITĂȚI

După cum s-a menţionat şi în alte ocazii (Capitolele 3,7,9), cunoașterea mai detaliată a procesului de peroxidare, mai ales în medii biologice a fost şi încă mai este limitată de tehnici şi posibilităţi de determinare neadecvate. În primul rînd, așa cum a mai fost subliniat în cursul capitolelor precedente, pentru găsirea unor metode adecvate este necesară cunoașterea aspectelor multiple ale peroxidării. Așa cum s-a arătat în Capitolul 1, peroxidarea este o etapă a procesului mai generalizat al autooxidării care începe cu activarea oxigenului şi producerea speciilor reactive $^1O_2$, $O_2^{\cdot-}$, $OH^{\cdot}$. Urmează apoi etapa propriu-zisă de peroxidare, descrisă în Capitolul 2 şi în final etapa de descompunere a peroxizilor (Capitolul 3.2) cu producere de compuşi carbonilici, acizi inferiori sau unele hidrocarburi volatile (etan). S-a mai subliniat că primele etape sînt cele mai dinamice datorită unui echilibru labil între factori prooxidanţi şi cei antioxidanţi (naturali sau sintetici). În consecinţă metodele de determinare pentru primele două etape trebuie să fie foarte rapide, sensibile (capabile de a sesiza compuşi sub 10^{-6} M) şi să poată fi folosite în condiţii puţin pretenţioase. Admiţînd aceste deziderate, reiese că atît pentru medii nebiologice, dar mai ales pentru cele biologice metodele chimice clasice utilizate cu rezultate uneori contradictorii nu sînt adecvate.

În acest sens, domeniul nebiologic este avantajat, fapt care a permis acumularea unor informaţii consistente, chiar dacă mai lipsesc încă multe detalii. În medii nebiologice, datorită componentelor mai simple implicate şi a posibilităţilor de a controla concentraţiile iniţiale şi cele finale în unii componenţi s-a putut întreprinde o tratare cinetică şi termodinamică mai simplă dar suficientă pentru cerinţele industriale şi găsirea unor antioxidanţi adecvaţi. Chiar şi aşa, totuşi şi în medii nebiologice se preferă determinarea compuşilor rezultaţi prin descompunerea peroxizilor (carbonili) care au o viaţă mai lungă şi se pretează unor tehnici mai precise.

Datorită descoperirii relativ recente a rolului activării O_2 în procesul autooxidării, determinarea speciilor reactive implicate nu a depăşit faza de laborator şi aspectul predominant teoretic. Aşa cum s-a arătat în Capitolul 1, identificarea acestor specii, datorită vieţii lor foarte scurte necesită aparaturi complicate, foarte sensibile şi costisitoare. Dealtfel studiul lor pare a fi concentrat în medii biologice. Cea mai rentabilă metodă a acestor specii este adăugarea în mediul de studiat a unor inhibitori specifici şi constatarea gradului de inhibare a peroxidării. Datorită interconexiunilor dintre aceste specii (exemplu reacţia Haber-Weiss, Capitolul 1.4,1.5), transformarea unui radical în altul este destul de obişnuită şi limitează metoda.

Scanned with OKEN Scanner

Astfel de inhibitori specifici sînt: pentru $^1O_2$, 1,3-difenilizobenzofuran [71], carotenoizi, amine terţiare, tocoferol, azidă, histidină; pentru $O_2^{\cdot-}$, superoxid dismutază purificată; pentru H_2O_2 catalază şi pentru $OH^{\cdot}$ manitol, formiat şi tiouree [36].

12.2. DETERMINĂRI ÎN MEDII NEBIOLOGICE

În medii nebiologice se folosesc o serie de metode specifice produsului studiat (polimeri, hidrocarburi, uleiuri, alimente) şi care urmăresc stabilirea gradului de îmbătrînire sau de perisabilitate datorită autooxidării. Astfel de metode sînt de strictă specialitate şi nu vor fi abordate. Comun totuşi tuturor produşilor menţionaţi în această carte este producerea peroxizilor şi a produşilor lor de descompunere. O astfel de testare se face de multe ori în condiţii artificiale (temperatură sau presiune) de îmbătrînire sau uzură pentru observarea rezistenţei produşilor sau a eficienţei unor antioxidanţi adăugaţi. Datorită complexităţii procesului de autooxidare se recomandă utilizarea mai multor metode cu principii diferite deoarece nu toţi componenţii sau toate calităţile produşilor de testat se autooxidează la fel.

Din tratarea cinetică a procesului de autooxidare (Capitolul 2.2) reiese că peroxizii sînt primii produşi formaţi şi că conţinutul de peroxizi măsurat corespunde cantităţii de peroxid nedescompus; o valoare crescută sugerînd o viteză mai mare de formare a peroxizilor decît cea de descompunere. Oricum, determinarea peroxizilor trebuie completată cu cea a compuşilor de descompunere (carbonil, acizi şi hidrocarburi inferioare).

Metodele chimice au fost cele mai răspîndite, titrarea iodometrică a peroxizilor din uleiuri fiind introdusă în 1915 de Vintilescu şi Popescu [91]. Datorită simplităţii ei, metoda iodometrică cu diferite îmbunătăţiri este încă folosită [6, 86] dar utilizînd o atmosferă de N_2 şi o citire spectrofotometrică. Alte metode chimice ca oxidarea Fe^{2+}, diclorfenolindofenol $SnCl_2$ [50] nu mai sînt folosite, datorită multiplelor interferenţe. Pentru controlul de calitate al produselor în care se formează peroxizi se folosesc hîrtii impregnate cu reactivi specifici ce dau reacţii cu schimbare de culoare. Astfel de hîrtii impregnate sînt fabricate de diferite firme (Merck) pentru mase plastice (polistiren) [47], uleiuri [55], grăsimi [53, 61], carne [46]. Pentru determinarea gradului de rîncezire a grăsimilor şi uleiurilor datorat formării peroxizilor se folosesc curent variante ale reacţiei acidului tiobarbituric (TBA) mult utilizată în determinări în sisteme biologice [27, 54].

Mult utilizate, mai ales pentru studiul cinetic, sînt metodele fizico-chimice ca cele polarografice [77], gaz-cromatografice [87], cromatografiei în lichide [5], spectrofotometrie în infraroşu [2] sau C^{14}-tetracianoetilenă pentru măsurarea conjugării nesaturate dien [92]. În general metodele fizico-chimice (polarografice) dau valori mai mici decît cele chimice (iodometrice).

Scanned with OKEN Scanner

Compușii carbonil rezultați din descompunerea peroxizilor au fost mult timp determinați prin metode chimice, bazate pe reacția grupării carbonil cu hidroxilamina (reacția 1) sau cu fenilhidrazina (reacția 2)

$$R-CHO + H_2NOH.HCl \rightarrow R-CH=NOH + HCl + H_2O \quad (1)$$

$$R-CHO + C_6H_5(NO_2)_2NHNH_2 \rightarrow C_6H_5(NO_2)_2NHN=CHR + H_2O \quad (2)$$

punctul final al titrării fiind determinat potențiometric sau colorimetric [50]. Compușii dicarbonil și carbonil nesaturați se determină prin reacția lor cu *p*-aminofenol [17].

Din cauza complexității produșilor de descompunere a peroxizilor se folosesc mai ales metode spectrofotometrice în UV și infraroșu [40]. Formarea unor compuși polinesaturați neconjugați se datorește grupării C=C *trans* cu o bandă de absorbție la 10,3 μ. Formarea hidroperoxizilor determină apariția unor benzi la 2,88 și 2,92 μ urmate de apariția benzilor compușilor carbonil de la 5,77, 5,81, 5,91 și 6,11 μ. În cursul autooxidării acizilor grași nesaturați se produce și o dimerizare a doi acizi printr-o reacție de tip Diels-Alder. Schimbări în benzile de la 10—11 μ indică izomerizări *cis-trans* și formarea unor noi legături conjugate. Cu cît descompunerea peroxizilor se intensifică apar noi benzi în infraroșu la 2,93 μ (hidroxili alcoolici), 5,72 μ (carbonili), 12,0 (epoxizi), 11,4—11,8 și 12,5 μ (alchil hidroperoxizi). În general dispariția benzii de la 3,2 μ indică polimerizarea.

Studiile în UV sînt de asemenea utile. Saponificarea acizilor grași nesaturați produce o creștere a absorbției în UV. Acizii grași cu legături nesaturate conjugate absorb într-o regiune largă de la 230—375 nm, conjugarea dien avînd o absorbție la 234 nm, iar cea trien la 268 nm. Gruparea carbonil dă o absorbție mare între 265—285 nm cu deplasări în cazul conjugării. Dien cetonele absorb la 278 nm fiind produse prin dehidratarea hidroperoxizilor conjugați dien.

Studiile spectrofotometrice în UV sau IR sînt deosebit de interesante și utile dar necesită îndepărtarea impurităților și prezența N_2 [81].

Eficiența antioxidanților utilizați în industrie se determină prin studiul inhibării *in vitro* a peroxidării produse în materialul testat (hidrocarburi, uleiuri, grăsimi) și măsurarea peroxizilor formați [43].

12.3. DETERMINĂRI ÎN MEDII BIOLOGICE

Lipsa unei metode adecvate de determinare a peroxizilor în medii biologice a limitat foarte mult progresul cunoștințelor în acest domeniu.

Așa cum s-a arătat în capitolele precedente (7, 10, 11) *in vivo*, fiziologic, trebuie să existe peroxizi în cantități extrem de mici (excepție H_2O_2) dar cantitatea lor crește rapid în cazul unor leziuni ale membranei celulare. De aceea, după sacrificarea animalului și prepararea unui omogenat tisular, detectarea unei cantități mari de peroxizi poate fi datorată și manipulării ori condițiilor experimentale. Diluția mare a omogenatelor (20—150 mg/ml), concentrația mare în fosfați (0,04—0,12 M), *p*H acid, prezența ionilor prooxidanți (Fe, Cu) creează condiții pentru formarea

Scanned with OKEN Scanner

rapidă a peroxizilor [13]. Nu s-a explicat satisfăcător de ce omogenate din mucoasă intestinală, măduvă osoasă și ascită Ehrlich prin incubare *in vitro* nu produc peroxizi cu toate că există cantități suficiente de lipide nesaturate. Cu toate că s-au elaborat metode foarte sensibile pentru determinarea H_2O_2 în țesuturi [38], datorită prezenței concomitente a sistemelor enzimatice ce catalizează descompunerea peroxidului, măsurarea lui este încă nerezolvată. În locul determinării concentrației absolute de H_2O_2 tisulară, Oshino și Chance [67] au măsurat viteza de formare a peroxidului din ficatul perfuzat prin spectrofotometria compusului I, H_2O_2-catalază. Inspirați de această tehnică, Sies și Summer [82] au măsurat capacitatea de metabolizare a peroxizilor de către ficatul perfuzat. Ei au găsit că ficatul descompune 3—4 μmoli hidroperoxizi/minut/gram concomitent cu eliberarea a 30 nmoli GSSG/μmol peroxid/minut/gram datorită acțiunii GSH peroxidazei. În cazul H_2O_2, viteza de formare în ficat este de 450 nmoli/minut/gram. Burk [18] a perfecționat această metodă pentru a diferenția diferite feluri de peroxizi, cît și enzimele implicate.

Cu tot progresul realizat prin aceste tehnici, determinarea peroxizilor lipidici continuă să preocupe atenția multor cercetători din considerente aplicative clinice. Datorită complexității mediilor biologice s-au folosit metode chimice. Cea mai veche metodă este cea iodometrică utilizată larg și în medii nebiologice, bazată pe reacția (3) :

$$ROOH + 2\,I^- + 2\,H^+ \rightarrow ROH + H_2O + I_2 \qquad (3)$$

Deși sensibilă, detectînd 1 μechivalent peroxid, metoda nu este specifică, nu se pretează la emulsii de fosfolipide, trebuie evitat O_2, iar punctul final este uneori sesizat mai dificil [24]. Folosirea capacității oxidante pentru reoxidarea unor coloranți în formă leuco (redusă), de tipul diclorfenolindolfenol, briliant cresil [74] nu au permis însă elaborarea unei metode satisfăcătoare pentru dozarea peroxizilor organici.

Pentru a sublinia interesul și efortul întreprins în găsirea unei metode satisfăcătoare menționăm pe scurt diferite tehnici propuse pentru determinarea H_2O_2 în țesuturi. Lipsa de specificitate și mica sensibilitate a metodelor clasice redox (manganometrică, iodometrică) au impus principii noi cum sînt oxidarea $TiSO_4$ sau $Fe(SCN)_2$ [25], a 2,6-diclorfenolindofenolului ca donor de hidrogen, inhibarea catalazei în prezența substratului de către aminotriazol [20], măsurarea CO_2 rezultat din acțiunea peroxidazică a catalazei asupra formiatului [1], măsurarea oxidării unui donor de H în prezența peroxidazei [1], decolorarea în urma oxidării scopoletinei (6-metil-7-hidroxi-1,2-benzopironă). Această determinare fluorometrică a permis măsurarea cantității de 10^{-8} M H_2O_2 produsă prin radioliza apei de către raze X (10 R) [73]. Creșterea fluorescenței diacetildiclorofluoresceinei în urma activării de către peroxid-peroxidază în mediu alcalin [83], determinarea histochimică folosind oxidarea de către peroxidază a 3-amino-9-etilcarbazolului [3] și în fine metoda propusă de Heath și Tappel [38] inspirată din mecanismul de acțiune al glutation peroxidazei (fig. 9.8) constituie noi metode enzimatice.

Din cele prezentate rezultă că pentru determinarea peroxizilor organici, din lipsă de metode directe satisfăcătoare s-a apelat la o metodă indirectă propusă de Bernheim [12] în 1948 și care după nenumărate modificări

Scanned with OKEN Scanner

a rămas şi astăzi la baza determinărilor de peroxizi, ba chiar s-a extins şi în industrie [15]. După cum se vede din fig. 12.1 acidul tiobarbituric (TBA) reacţionează la fierbere cu malonic dialdehida (MDA) compus rezultat din descompunerea peroxizilor lipidici (Capitolul 11) sau cu un extract în acid tricloracetic sau acid percloric de acizi graşi peroxidaţi,

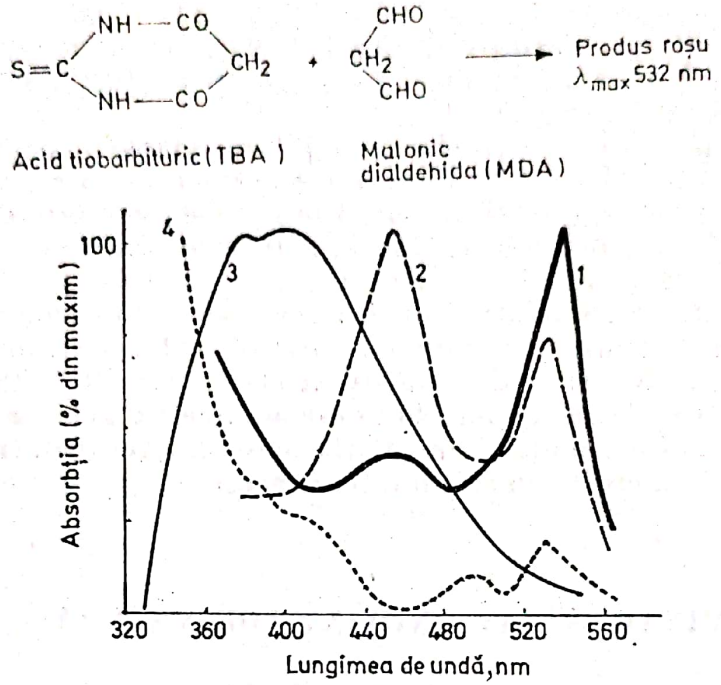


Fig. 12.1. A. Reacţia dintre acidul tiobarbituric (TBA) şi malonic dialdehida (MDA). B. Absorbţia produşilor reacţiei TBA cu MDA (1), acidul linoleic autooxidat (2) şi aldehida crotonică (3) şi extract lipidic autooxidat din testicol de şoarece (4). După Philpot [74]

fragmente de membrană, omogenate tisulare sau ser. Produsul roşu rezultat are un maxim la 532 nm şi are un coeficient de extincţie molar de 1,56. $\cdot 10^5$ $cm^2 \cdot mmol^{-1}$. Metoda este foarte simplă, rapidă şi puţin costisitoare. Prezenţa HCl previne adsorbţia produsului colorat de precipitatul proteic, turbiditatea datorită lecitinei se îndepărtează prin extracţie într-un solvent organic, $CHCl_3$ sau butanol. Glucide, acid sialic, pirimidine, compuşi heminici, agenţi oxidanţi deşi interferă cu TBA dau produşi ce absorb la alte lungimi de undă (fig. 12.1. B). După cum au arătat McKnight şi Hunter [58], prezenţa în mediul de reacţie a Fe^{2+} sau Fe^{3+} între 10—500 μM produce o creştere a culorii finale de 2—20 ori. Prin faptul că prezenţa Fe produce o creştere apreciabilă şi a consumului de O_2 această interferenţă se datoreşte intensificării peroxidării sub acţiunea prooxidantă a Fe. Interesant de amintit că acest puternic efect catalizator al Fe apare doar la emulsii de acizi graşi nesaturaţi. În cazul omogenatelor din ficat, plămîni şi rinichi (0,2—2 mg proteină/ml) acest efect nu se observă, iar pentru creier este uşor crescut.

Totuşi cea mai spinoasă problemă rămîne identificarea produşilor carbonil care reacţionează cu TBA, din care MDA constituie doar o parte.

Scanned with OKEN Scanner

Dealtfel Philpot [73] a propus introducerea termenului de *pro-red* pentru a desemna compuşii rezultaţi din peroxidarea lipidelor tisulare care reacţionează cu TBA. Chiar şi pentru acid linolenic autooxidat se observă (fig. 12.1. B) pe lîngă produsul de absorbţie la 532 nm, un alt maxim la 450 nm, care creşte în prezenţa Fe [75]. Cu toate criticile aduse acestei metode, chiar şi recente [35], reacţia TBA s-a extins nu numai la studii de peroxidare în mitocondrii [58] sau microzomi [10] dar şi în ser, devenind astfel un test cu aplicativitate clinică [41, 95]. De asemenea, MDA apare şi *in vivo*, fiind detectat în piele [59] sau în cursul biosintezei prostaglandinelor de către trombocite [84].

Studiul peroxidării lipidelor mai puţin complexe poate fi efectuat prin urmărirea absorbţiei în UV. Lipidele peroxidate dau o bandă intensă în jur de 233 nm cu $\varepsilon_{mM} = 21{,}7$. Dar şi produsele rezultate din descompunerea peroxizilor au maxime la 230 şi 260—280 nm, ceea ce micşorează aplicativitatea şi posibilitatea de apreciere cantitativă.

Interesantă este relaţia între peroxidarea lipidelor microzomiale din ficat *in vivo* indusă prin administrarea CCl_4 la şobolani şi cantitatea de etan expirat observată de Lindstrom şi Anders [48]. Etanul pare că rezultă din peroxidarea şi ulterior descompunerea acizilor $\omega - 3$ graşi (acid linolenic). Deocamdată instalaţia costisitoare (cameră metabolică cuplată cu un gaz-cromatograf) limitează acest test promiţător al peroxidării *in vivo*.

12.4. DETERMINAREA ANTIOXIDANŢILOR NATURALI

Un studiu complet al peroxidării în medii biologice impune şi cercetarea rolului antioxidanţilor naturali, care datorită eficienţei lor în mod normal anihilează încă de la început procesul autooxidării (Capitolul 9).

Acidul ascorbic este cel mai cunoscut antioxidant, deşi rolul lui în organism este departe de a fi cunoscut în detaliu. Majoritatea cercetătorilor [15] preferă încă metoda Roe [79] cu 2,4-dinitrofenil-hidrazină sau cu diclorfenolindofenol care deşi datează din 1948 totuşi este satisfăcătoare.

În schimb *vitamina E* (α-tocoferol), deşi i se atribuie un rol important ca antioxidant natural şi este larg utilizat industrial, nu i s-a găsit o metodă de dozare perfectă. Mai răspîndite sînt metodele propuse de Hashim [37] şi Wiltting [94], deşi tehnica radiochimică descrisă de Green şi Diplock [32] este mult mai sensibilă. Rolul seleniului ca antioxidant este încă prea recent pentru a se stabili o metodă recomandabilă. Cel mai mult se foloseşte o metodă fluorometrică cu 2,3-diaminonaftalen [32], iar pentru analize şi mai pretenţioase cum ar fi studiul structurii GSH peroxidazei se apelează la activarea cu neutroni după Flohe şi Gunzler [30]. Amintim că valoarea normală medie a Se în serul uman este de $61{,}8 \pm 15{,}5$ ng/ml [32, 62].

Compuşii conţinînd gruparea *sulfhidril* (SH) sînt însă cei mai răspîndiţi antioxidanţi din medii biologice. Aşa cum s-a arătat în Capitolul 9, ca şi în cazul ascorbatului, compuşii SH pot fi prooxidanţi în anumite condiţii. Determinarea compuşilor SH poate oferi material pentru un întreg capitol datorită atît variaţiei principiilor de dozare, cît şi al specificităţii reactivilor sau al interferenţelor [42], din care cauză măsurarea

Scanned with OKEN Scanner

lor este relativă [66]. Marea variaţie de metode propuse indică interesul cercetătorilor dar şi un grad de confuzie. Marea varietate în rezultate provine de la gradul diferit de specificitate al reactivilor, dar şi de accesibilitatea acestora la gruparea SH. Gradul de diluţie al probei şi starea de denaturare a proteinei sînt esenţiale în expunerea grupărilor SH mai ales proteice. Tot în cazul acestora, dar şi al tiolilor simpli, reactivitatea grupărilor SH nu este identică depinzînd de gradul de ionizare deci de condiţiile de mediu şi de microstructura învecinată ; un amplu studiu în acest sens de către Olinescu şi Mărgineanu [65] indică mari deosebiri între diferiţi tioli în reacţia lor cu un reactiv specific în prezenţa proteinelor serice.

Determinarea grupărilor SH cuprinde măsurarea grupărilor tiol totale libere, a SH aparţinînd proteinelor (PrSH), a tiolilor simpli, neproteici (NPSH) şi a grupărilor SS (disulfurice). În organism între toate aceste feluri de grupări SH există reacţii frecvente de interschimb, iar formarea de disulfuri mixte cum ar fi glutation-coenzima A sau cistamină-grupări SH ale albuminei serice este de asemenea răspîndită [63]. Un alt factor ce trebuie luat în considerare în determinarea grupărilor SH este marea lor oxidabilitate în omogenatele tisulare [66], din care cauză trebuie folosită apă bidistilată în prepararea reactivilor şi adăugarea unor agenţi complexanţi (EDTA) pentru a preveni acţiunea prooxidantă a ionilor metalici. Grupările SH libere, totale se determină prin reacţia reactivului specific cu proba în totalitate. În urma precipitării proteinelor cu acid metafosforic sau percloric (ţinut la rece) şi centrifugare, reacţia supernatantului cu reactivul respectiv permite dozarea NPSH. Prin diferenţă se obţine PrSH. Determinarea disulfurilor se face tot cu reactiv specific, dar după o prelabilă reducere cu borohidrură sau mai bine cu ditiothreitol sau reactivul lui Cleland ($SH-CH_2-(CHOH)_2-CH_2-SH$) [85, 93].

Ca reactivi specifici grupărilor SH, au fost propuşi numeroşi compuşi anorganici sau organici datorită marii reactivităţi a acestei grupări. Metodele titrimetrice folosind compuşi anorganici ca $KI-I_2$, Cu^{2+}, Ag^{+}, fericianură etc., nu pot fi folosite în medii biologice complexe. Un timp au fost folosite metode cu reactivi alchilanţi, cum sînt iodoacetamidă [11] sau fluoropiruvat [39], ori cu *N*-etilmaleimidă [22]. Acum cele mai răspîndite metode pentru determinarea grupărilor SH folosesc reactivi organici ai Hg cum sînt *p*-cloromercuribenzoat [16], cu absorbţia produsului final la 250 nm, dar mai ales acidul 5,5′-ditiobisnitrobenzoic (DTNB) [26, 66, 78] şi acidul 6,6′-ditionicotinic [4]. Utilizarea determinării grupărilor SH în membrane necesită prezenţa unor agenţi de solubilizare cum sînt ureea, dodecilsulfat, fosfolipază A [78] pentru expunerea tiolilor mai puternic ascunşi în straturile lipidoproteice. *Glutationul*, mai ales sub formă redusă (GSH) constituie majoritatea tiolilor simpli intracelulari, fiind o rezervă de grupări SH mobilă, utilizabilă în multiple reacţii şi procese. GSH este de asemenea substratul GSH peroxidazei, enzimă cheie în protecţia organismului faţă de o gamă largă de peroxizi. Metodele mai des folosite sînt variante ale tehnicii propuse de Ellman [26] cu reactivul DTNB cum sînt cele propuse de Beutler [14] sau Owens [69]. GSH şi GSSG se pot determina specific prin cuplarea reacţiilor lor redox cu cele catalizate de glioxalază şi GSH reductază [21]. După cum s-a arătat ceva mai înainte (Capitolul 12.3), determinarea efluxului de GSH şi GSSG

Scanned with OKEN Scanner

dintr-un organ izolat, perfuzat sau chiar din animalul întreg constituie metoda cea mai recentă pentru aprecierea formării și metabolizării peroxizilor larg folosită de cercetători americani [68] și germani [8, 82].

Superoxid dismutaza (SOD) constituie prima linie de apărare enzimatică contra speciilor reactive ale O_2, respectiv $O_2^{\cdot-}$. Această enzimă fiind destul de recent descoperită (Capitolul 9.2), nici descoperitorii ei nu s-au pronunțat în favoarea unei anume metode [56]. Determinarea SOD, în linii mari, se compune dintr-un sistem generator de $O_2^{\cdot-}$ și o reacție-detector cuplată cu primul sistem; cele două componente fiind prezentate schematic în fig. 12.2. Reacția catalizată de xantin oxidază (Capitolul 7.2) este cea mai pretențioasă din punct de vedere al aparaturii și poate fi cuplată cu oricare sistem detector [56], dar datorită generării mai multor radicali și a prezenței componenților reacției în probele biologice se aplică doar sistemelor biologice simple. În general toate metodele cunoscute pentru determinarea activității SOD sînt indirecte prin aprecierea capacității enzimei de a inhiba producerea de $O_2^{\cdot-}$ detectată printr-un sistem detector. Singura metodă directă cunoscută pînă în prezent a fost elaborată de Marklund [52] prin amplificarea de către SOD a reacției de disproporționare a $O_2^{\cdot-}$ obținută din KO_2:

$$2\,O_2^{\cdot-} + 2H^+ \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + O_2$$

Metoda necesită un spectrofotometru înregistrator de mare performanță cuplat cu un *p*H-metru, deoarece conform reacției de mai sus, viteza de disproporționare scade cu un factor de 10 pentru o creștere a *p*H-ului cu o unitate. Metoda se pretează pentru sisteme simple. Pentru determinarea activității SOD din sînge sau țesuturi trebuie în primul rînd îndepărtată hemoglobina, care ar influența mult reacția. Aceasta se face prin precipitarea ei cu un amestec de cloroform și etanol [9]. Datorită folosirii unor metode cu principii variate încă nu s-a ajuns la o uniformizare în unitățile de activitate ale enzimei [61].

Catalaza și *peroxidazele* au fost descrise magistral din punct de vedere al metodologiei de Maehly și Chance [50], iar metodele recomandate sînt folosite și astăzi. Astfel în cazul sistemelor biologice simple, activitatea catalazei se determină în mod curent prin urmărirea scăderii absorbției H_2O_2 de la 230 nm. Pentru sisteme biologice mai complexe se folosește mai ales metoda descrisă de Feinstein [28] cu perborat.

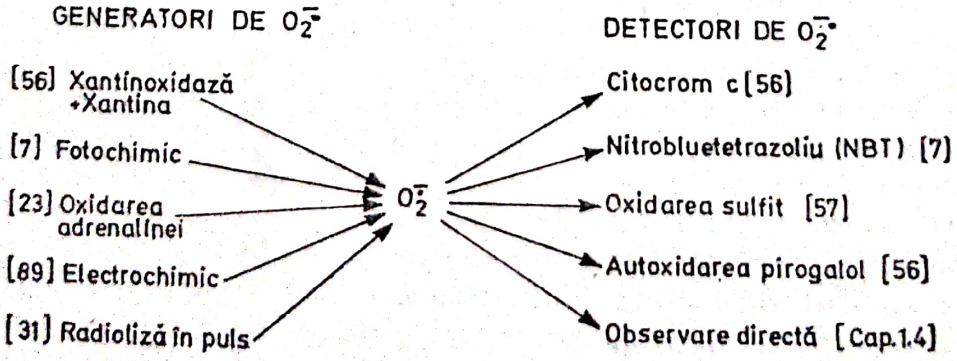


Fig. 12.2. Principiile determinărilor activității superoxid dismutazei. Numerele din paranteze indică datele bibliografice respective.

Scanned with OKEN Scanner

Dacă metodele de determinare a activității catalazei descrise în jurul anului 1950 mai sînt utilizate și astăzi, nu același lucru se poate spune despre peroxidaze. Aceasta se datorează mai ales descrierii unor noi tipuri de peroxidaze, cu roluri mai mult sau mai puțin cunoscute. După cum au arătat Keilin și Hartree [44] oxidarea peroxidazică a H_2O_2 este o proprietate comună tuturor hemoproteinelor, hematinei și Fe, dar cu mari diferențe în viteza și mecanismul de reacție. Catalaza și peroxidazele sînt cu peste 4 ordine de mărime mai eficiente în catalizarea descompunerii H_2O_2. Activitatea peroxidazică a catalazei se testează în prezența unui donor de hidrogen (etanol) și a unui sistem generator de H_2O_2 [29, 44, 50]. Pentru determinarea activității peroxidazelor se urmărește spectrofotometric dispariția donorului de hidrogen sau formarea produsului de oxidare. Ca donori de hidrogen se folosesc mai ales pirogalolul [19], guaiacolul [80], acidul ascorbic, citocromul *c* [80], 2,6-dimetoxifenolul [29] etc. Pentru diferitele tipuri de peroxidaze, metodele mai cunoscute sînt: pentru mieloperoxidază din leucocite [96], tirozin peroxidaza [70], tiroid peroxidaza [76], lactoperoxidaza [88].

Glutation peroxidaza, după cum s-a arătat în Capitolul 9.5, constituie alături de SOD una din cele mai eficiente linii de apărare contra peroxizilor. Specificitatea ei pentru glutation este totală, în schimb față de peroxizi are o foarte mică specificitate. În metodele de determinare a activității enzimei se folosește ori H_2O_2, ori un peroxid organic stabil așa cum este cumen hidroperoxidul sau linoleat hidroperoxid. Un prim grup de metode determină consumul de GSH în reacția catalizată de enzimă (64, 74), un dezavantaj fiind reacția neenzimatică destul de mare. Alt grup de metode este constituit din mai multe reacții cuplate conform acțiunii enzimei *in vivo* (fig. 9.8) [33, 61], care păstrează un nivel constant al regenerării GSH, dar sistemul este sensibil la urme de hemoglobină și reacția neenzimatică nu este abolită. O discuție recentă asupra metodelor existente de dozarea GSH Px se datorește lui Gunzler [34].

Deoarece studiul peroxidării în medii biologice este încă la început, nici metodele de dozare ale acestor intermediari sau produșii lor de descompunere și nici cele ale sistemelor de apărare ale organismelor nu sînt perfecte, așa cum se observă din efortul continuu de ameliorare a tehnicilor existente sau de găsirea unor noi principii de dozare.

BIBLIOGRAFIE

1. H. AEBI, *Rad. Res. Suppl.*, **3**, 136 (1963).
2. N. H. AHLERS, N.G. TAGGERT, *Analyst*, **79**, 70 (1954).
3. J. M. ALLEN, R. ABRAMS, T.R. HOGNESS, *Science*, **149**, 1507 (1965).
4. Y. ANDO, M. STEINER, *Biochim. Biophys. Acta*, **311**, 26 (1973).
5. H. AOSHIMA, *Analyt. Biochem.*, **87**, 49 (1978).
6. T. ASAKAWA, S. MATUSHITA, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **55**, 619 (1978).
7. C. AUCLAIR, J. HAKIM, P. BOIVIN, *FEBS Lett.*, **79**, 390, (1977).
8. G. BARTOLI, H. SIES, *FEBS Lett.*, **86**, 89 (1978).
9. G. BARTOSZ, C. TANNERT, *Experientia*, **34**, 1464 (1978).
10. A. BENEDETTI, A.F. CASINI, *Res. Comm. Chem. Pathol.*, **17**, 519 (1977).

Scanned with OKEN Scanner

56. J.M. MC CORD, I. FRIDOVICH, in „Superoxide and Superoxide Dismutase" edit. A.M. Michelson, J.M. Mc Cord, I. Fridovich, Academic Press, New York, p. 11, 1977
57. J.M. MC CORD, I. FRIDOVICH, *J. Biol. Chem.*, **243**, 5753 (1968)
58. R.C. MC KNIGHT, F.E. HUNTER, *Biochim. Biophys. Acta*, **98**, 640 (1965)
59. H. MEFFERT, W. DIEZEL, N. SONNICHEN, *Experientia*, **32**, 1397 (1976)
60. H. MEYER, W. FISCHER, Ger. Offen, 2, 630 (1978)
61. M. MINAMU, *Clin. Chim. Acta.*, **92**, 337 (1979)
62. W. NAKAMURA, S. HOSODA, *Biochim. Biophys. Acta*, **358**, 251 (1974)
63. S. NIȚĂ, R. OLINESCU, M. ȘERBAN, *Rev. Roum. Biochim.*, **13**, 117 (1975)
64. R. OLINESCU, S. NIȚĂ, *Rev. Roum. Biochim.*, **10**, 119 (1973)
65. R. OLINESCU, I. MĂRGINEANU, *Rev. Roum. Biochim.*, **11**, 103 (1974)
66. R. OLINESCU, C. ULEU, *Rev. Roum. Biochim.*, **11**, 283 (1974)
67. N. OSHINO, B. CHANCE, H. SIES, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **154**, 117 (1973)
68. N. OSHINO, B. CHANCE, *Biochem. J.*, **162**, 504 (1977)
68. C.W. OWENS, R.V. BELCHER, *Biochem, J.*, **94**, 705 (1965)
70. R.P. PATEL, M.R. OKUN, *Biochem. J.*, **142**, 441 (1974)
71. T.L. PEDERSEN, S.D. AUST, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **52**, 1071 (1973)
72. H. PERSCHE, F. BROELA, *Nature*, **190**, 257 (1961)
73. J.S. PHILPOT, *Rad. Res., Suppl.*, **3**, 55 (1963)
74. R.E. PINTO, W. BARTLEY, *Biochem. J.*, **112**, 109 (1969)
75. N.A. PORTER, J. NIXON, *Biochim. Biophys. Acta*, **441**, 506 (1976)
76. A.B. RAWITCH, A. TAUROG, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **194**, 244 (1979)
77. K.S. RHEE, *J. Food Sci.*, **43**, 6 (1978)
78. P.W. RIDDLES, *Analyt. Biochem.*, **94**, 75 (1979)
79. J.H. ROE, M.D. MILLES, *J. Biol. Chem.*, **174**, 201 (1948)
80. B.C. SAUNDERS, G.H. SIEDLE, „Peroxidase", Butterworth, London, 1964
81. E.R. SHERWIN, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **55**, 809 (1978)
82. H. SIES, K.H. SUMMER, *Eur. J. Biochem.*, **57**, 503 (1975)
83. A. SKESTON, R. BRANDT, *Analyt. Biochem.*, **11**, 1 (1965)
84. J.B. SMITH, C.M. INGERMAN, *J. Lab. Clin. Med.*, **88**, 167 (1976)
85. K. SUBRAMONIA, W.A. KLEE, *J. Biol. Chem.*, **248**, 707 (1973)
86. T. TAKAHAGI, Y. MITSUNO, *Lipids*, **13**, 147 (1978)
87. J. TERAO, S. MATSUSHITA, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **54**, 234 (1977)
88. E.L. THOMAS, T.M. AUNE, *Infect. Immunit.*, **20**, 456 (1978)
89. D.D. TYLER, *Biochem., J.*, **147**, 493 (1975)
90. M. UCHIYAMA, M. MIHARA, *Analyt. Biochem.*, **86**, 271 (1978)
91. I. VINTILESCO, A. POPESCO, *J. Pharm. Chim.*, **12**, 318 (1915)
92. R.L. WALLER, R.O. RECKNAGEL, *Lipids*, **12**, 914 (1977)
93. J.L. WEBB, „Enzyme and Metabolic Inhibitors" vol. 2, Chap. 4, Academic Press, New York, 1965
94. L.A. WILTING, *Archiv. Biochem. Biophys.*, **129**, 142 (1969)
95. K. YAGI, *Biochem. Med.*, **15**, 212 (1976)
96. I. YAMAZAKI, T. ODAJIMA, *Biochem. Biophys. Acta*, **284**, 355 (1972)

Scanned with OKEN Scanner

POSTFAȚĂ

În perioada 1979—1981, interesul multidisciplinar pentru peroxidare a fost confirmat, ba chiar întărit, atît din punct de vedere al cercetării fundamentale, cît și aplicativ. Așa cum era de așteptat, cele mai interesante descoperiri au fost obținute în domeniile biologiei și medicinei. Ca ilustrare a acestei tendințe menționăm că din cele șase simpozioane ținute în această perioadă, toate au avut drept tematică probleme ale peroxidării din domeniile amintite.

Astfel, în primul rînd superoxid dismutaza (SOD) cunoaște o aplicativitate mărită în medicină, conform proprietăților prezentate în capitolele 9.2 și 10.5. Se extinde tratamentul local cu SOD purificat în reumatism, cistită, boli autoimune (R. Beckmann, *Bull. europ. Physiopath.*, **17**, 275 (1981), în care superproducerea de $O_2^{\cdot-}$ de către macrofage afectează și țesuturile vecine focarului inflamator.

În cancer, conform celor menționate în capitolul 11.4, a devenit evidentă scăderea pînă la dispariție a SOD din mitocondriile celulelor tumorale, cu atît mai mare, cu cît procesul neoplazic este mai agresiv. O capacitate normală de producerea $O_2^{\cdot-}$ cuplată cu o activitate scăzută a SOD constituie o trăsătură comună celulelor tumorale, dar și celor primitive (eucariotice) nediferențiate. Producerea de H_2O_2 în urma metabolizării unor citostatice ca daunomicina, bleomicina, mitomicina și streptonigrina constituie adevăratul agent citolitic, dar acțiunea acestui peroxid este contracarată de GSH peroxidaza din tumoră, determinînd pe această cale rezistența acesteia și micșorarea efectului terapeutic.

Peroxizii lipidici au mai fost detectați în diferite stări patologice, cum sînt: ischemiile cardiace și experimentale, șoc traumatic, cataracte și alte retinopatii, silicoză, insuficiență hepatică, distrofie musculară, diabet etc., adăugîndu-se astfel celor menționate anterior.

Ca inhibitori naturali ai peroxidării, pe lîngă factorii menționați în capitolul 9, a mai fost confirmată capacitatea antioxidantă a ceruloplasminei din ser și s-a descoperit că lactoferina din lapte poate lega puternic 2 atomi Fe^{3+}/moleculă, inhibînd astfel peroxidarea produsă de acest prooxidant (Capitolele 7.4. și 8.1.). Prin acțiunea antioxidantă a lactoferinei s-a explicat de ce laptele matern nu rîncezește ușor.

Domeniul cel mai studiat pare să fie cel legat de metabolizarea acidului arachidonic (Capitolul 7.5), component frecvent al membranelor celulare și substrat de predilecție al peroxidării. Eliberarea acestui acid (AA) din membrane se face în urma acțiunii nespecifice a unor compuși cu structuri variate ca lectine (concanavalină, fitohemaglutinină), endotoxine, acizi grași etc., care activează fosfolipazele A_2 și C, scinzînd fosfatidil inozitolul în AA și diacilglicerol. Odată eliberat, AA poate fi metabolizat prin mai multe căi metabolice în funcție de necesitățile și condițiile locale.

Scanned with OKEN Scanner

Majoritatea izomerilor și derivaților AA dau reacție pozitivă pentru peroxizii, fiind substraturi pentru prostaglandine sau agenți chemotactici pentru leucocitele fagocitante. Balanța dintre prostacicline și tromboxani (Capitolul 7.5.2) joacă un rol deosebit în dezvoltarea aterosclerozei și a trombozei arteriale. Frecvența mult scăzută a bolilor coronariene la femei se datorește concentrației crescute de estradiol, care stimulează biosinteza prostaciclinei (inhibitor puternic al agregării trombocitelor). Estradiolul nu influențează biosinteza prostaglandinelor din trombocite, ci doar din pereții vaselor sanguine.

Chimiotactismul, prin care macrofagele și granulocitele migrează spre locul infecției, a declanșat o serie de lucrări care au permis identificarea a cel puțin unui factor chemotactic (FC) alcătuit din AA peroxidat legat de albumina serică. În acest fel, efectul major al SOD administrat în locul inflamației ar consta în inhibarea producerii CF, micșorînd astfel extinderea procesului inflamator. Celula fagocitantă stimulată produce și eliberează leucotriene, compuși cu acțiune chemotactică și cu structură neelucidată. Biosinteza lor este strîns legată de AA și pare a fi reglată de concentrația GSH din macrofag.

Lipoxigenaza (Capitolul 7.4.4) din trombocite este inhibată de majoritatea medicamentelor antiinflamatoare (aspirina), modificîndu-se astfel biosinteza prostaglandinelor. Un produs al oxidării AA de către lipoxigenază, 15-hidroperoxid, inhibă proliferarea și maturarea limfocitelor. Tot lipoxigenaza pare a fi implicată în biosinteza „*slow reacting substances*", compuși puțin cunoscuți, eliberați în cursul procesului inflamator.

Oxidarea AA pare să fie mult implicată și în mitogeneză acționînd ca un semnal. Se știe că prin legarea anticorpilor sau a lectinelor de suprafața limfocitelor se declanșează sinteza acidului dezoxiribonucleic, a mitogenezei și a modulării receptorilor de pe suprafața membranei. S-a constatat că în prealabil se produce o metilare a fosfolipidelor din membrane și o eliberare de AA. Concomitent se modifică grupările SH de suprafață determinînd modularea receptorilor. Marea sensibilitate a limfocitelor la radiații pare să fie datorată capacității reduse de regenerare a GSH și a grupărilor SH.

Capacitatea distructivă, citotoxică a oxigenului activat (Capitolele 1.5 și 11.5) este folosită de celulele macrofage în distrugerea agenților patogeni. Dar aceeași capacitate poate fi folosită și de limfocitele K („*killer*", ucigașe) în distrugerea unor celule străine organismului sau tumorale. Natura factorilor citotoxici este variată, cuprinzînd atît radicalii oxigenului dar și unele enzime. Capacitatea citotoxică a macrofagelor este stimulată de limfochine în paralel cu schimbarea compoziției lipidelor din membrana celulară.

În domeniul metodologic al peroxidării predomină multiplele aplicații ale chemiluminiscenței (Capitolele 4.3. și 12.3) cuprinzînd în ultimii trei ani peste 300 lucrări. Echipa profesorului Chance din Philadelphia este cea mai avansată, propunînd printre alte aplicații, o metodă de studiu pe organ intact (ficat), *in situ*, a capacității funcționale, de rezistență la atac oxidativ și chiar un studiu bidimensional al suprafeței organului respectiv. (*Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* **77**, 347 (1980). Interesul crescînd pentru această metodă ilustrează o tendință similară pentru peroxidare, ca proces complex, existent în organismele vii.

Scanned with OKEN Scanner